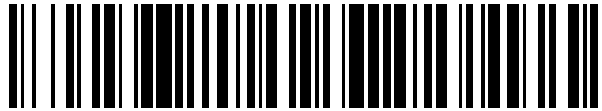


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 545**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2007 PCT/US2007/019481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2008 WO08030539**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007 E 07837840 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2063907**

54 Título: **Métodos y composiciones basadas en conjugados de toxina diftérica-interleucina-3**

30 Prioridad:

**07.09.2006 US 843471 P**  
**01.06.2007 US 932772 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2017**

73 Titular/es:

**FRANKEL, ARTHUR E. (100.0%)**  
**617 Bishop Lane North**  
**Mobile, AL 36608, US**

72 Inventor/es:

**FRANKEL, ARTHUR E.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 646 545 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

Métodos y composiciones basadas en conjugados de toxina diftérica-interleucina-3

## Descripción

**1. CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención proporciona métodos de direccionamiento a células que expresan el receptor de interleucina-3 y, en particular, de inhibición del crecimiento de tales células usando un conjugado de toxina diftérica-interleucina-3 humana (DT-IL3) que es tóxico para las células que expresan el receptor de interleucina-3. En realizaciones preferidas, el conjugado DT-IL3 es una construcción recombinante en la que el ADN que codifica IL-3 se inserta en lugar del dominio de unión a receptor de la toxina diftérica (quedando intactas las regiones catalíticas y de translocación de la toxina diftérica) que cuando se traduce produce una proteína que comprende los aminoácidos 1-388 de la toxina diftérica fusionada mediante un conector peptídico con la interleucina-3 humana de longitud completa. En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención se refieren a la administración de un conjugado DT-IL3 para inhibir el crecimiento de células cancerosas y/o a células madre cancerosas en seres humanos, células que expresan una o más subunidades del receptor de interleucina-3. Células a modo de ejemplo incluyen las células cancerosas y las células madre cancerosas de leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico. En otros aspectos, los métodos de la presente divulgación se refieren a purgar *ex vivo* la médula ósea o sangre periférica para eliminar células que expresan una o más subunidades del receptor de interleucina-3 de forma que la médula ósea o sangre periférica purgadas sean adecuada, por ejemplo, para el trasplante autólogo de células madre de nuevo al paciente para restaurar la función hematopoyética (por ejemplo, como puede requerirse tras quimioterapia de dosis alta para el cáncer).

**2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION****2.1 TERAPIA DEL CÁNCER**

El cáncer es una de las afecciones sanitarias más significativas. *Cancer Facts and Figures, 2003*, de la Asociación Americana del Cáncer, predice que más de 1,3 millones de estadounidenses recibirán un diagnóstico de cáncer este año. En los Estados Unidos, el cáncer es la enfermedad solo superada por la enfermedad cardíaca en mortalidad representando una de cuatro muertes. En 2002, los Institutos Nacionales de Salud estimaron que los costes totales del cáncer ascendieron a 171,6 billones de dólares, con 61 billones de dólares en gastos directos. Se espera ampliamente que la incidencia del cáncer aumente a medida que aumenten las edades de la población de EE.UU., aumentando además el impacto de esta afección. Los presentes regímenes de tratamiento para el cáncer establecidas en los años 70 y 80 no han cambiado espectacularmente. Estos tratamientos, que incluyen quimioterapia, radiación y otras modalidades que incluyen terapias dirigidas más nuevas, han mostrado beneficio de supervivencia global limitado cuando se utilizaron en la mayoría de los cánceres comunes en estado avanzado ya que, entre otras cosas, estas terapias se dirigen principalmente a la masa tumoral.

Más específicamente, el diagnóstico de cáncer convencional y las terapias hasta la fecha han intentado detectar y erradicar selectivamente células neoplásicas que son en gran parte de rápido crecimiento (es decir, células que forman la masa tumoral). Los regímenes de oncología estándar han sido frecuentemente en gran parte diseñados para administrar la dosis más alta de irradiación o un agente quimioterapéutico sin excesiva toxicidad, es decir, frecuentemente denominada la "máxima dosis tolerada" (MTD) o "nivel de efecto adverso no observado" (NOAEL). Muchas quimioterapias para el cáncer convencionales (por ejemplo, agentes alquilantes tales como ciclofosfamida, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, y alcaloides de plantas tales como vincristina) e irradioterapias convencionales ejercen sus efectos tóxicos sobre células cancerosas interfiriendo en gran parte con los mecanismos celulares implicados en el crecimiento celular y la replicación de ADN. Los protocolos de quimioterapia también implican frecuentemente la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos en un intento por aumentar la eficacia del tratamiento. A pesar de la disponibilidad de una gran variedad de agentes quimioterapéuticos, estas terapias tienen muchos inconvenientes (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" en *Scientific American Medicine*, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Cap. 12, secc. X). Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos son tristemente tóxicos debido a efectos secundarios no específicos en células de rápido crecimiento tanto normales como malignas; por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos producen efectos secundarios significativos, y frecuentemente peligrosos, que incluyen depresión de la médula ósea, inmunosupresión y dolor gastrointestinal, etc.

Otros tipos de terapias para el cáncer tradicionales incluyen cirugía, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia de antiangiogénesis, terapia dirigida (por ejemplo, terapia dirigida a una diana de cáncer tal como Gleevec® y otros inhibidores de tirosina cinasas, Velcade®, Sutent®, et al.), y tratamiento de radiación para erradicar células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en *Scientific American: Medicine*, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Cap. 12, secc. IV). Todos estos enfoques pueden plantear inconvenientes significativos para el paciente, que incluyen una falta de eficacia (en términos de resultado a largo plazo (por ejemplo, debido al fallo en dirigirse a células madre de cáncer) y toxicidad (por ejemplo,

debido a efectos no específicos sobre tejidos normales)). Por consiguiente, se necesitan nuevas terapias para mejorar las perspectivas a largo plazo de los pacientes con cáncer.

## 2.2 CÉLULAS MADRE DE CÁNCER

5 Las células madre de cáncer comprenden una subpoblación única (frecuentemente 0,1-10 % o así) de un tumor que, con respecto al 90 % restante o así del tumor (es decir, la masa tumoral), son más tumorigénicas, de crecimiento relativamente más lento o quiescentes, y frecuentemente relativamente más quimiorresistentes que la masa tumoral. Dado que las terapias y regímenes convencionales han sido diseñados, en gran parte, para atacar células que proliferan rápidamente (es decir, aquellas células cancerosas que comprenden la masa tumoral), las células madre cancerosas que son frecuentemente de crecimiento lento pueden ser relativamente más resistentes que la masa tumoral de crecimiento más rápido a las terapias y regímenes convencionales. Las células madre de cáncer pueden expresar otras características que las hace relativamente quimiorresistentes tales como vías multirresistentes y antiapoptóticas. Lo anteriormente mencionado constituiría un motivo clave para el fracaso de los regímenes de tratamiento de oncología estándar para garantizar el beneficio a largo plazo en la mayoría de los pacientes con cánceres de estadio avanzado – es decir, el fracaso de dirigirse adecuadamente a y erradicar células madre de cáncer. En algunos casos, una célula(s) madre de cáncer es la célula fundadora de un tumor (es decir, es la progenitora de las células cancerosas que comprenden la masa tumoral).

Se han identificado células madre de cáncer en una gran variedad de tipos de cáncer. Por ejemplo, Bonnet et al., usando citometría de flujo, fueron capaces de aislar las células de leucemia que llevan el fenotipo específico CD34+ CD38-, y posteriormente demostraron que son estas células (que comprenden <1 % de una leucemia dada), a diferencia del 99+ % restante de la masa de leucemia, las que son capaces de recapitular la leucemia desde cuando se derivó cuando se transfirió en ratones inmunodeficientes. Véase, por ejemplo, "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell", Nat. Med. 3:730-737 (1997). Es decir, estas células madre cancerosas se encontraron como <1 en 10.000 células de leucemia, aunque a esta baja frecuencia la población era capaz de iniciar y transferir en serie una leucemia humana en ratones con inmunodeficiencia combinada grave / diabéticos no obesos (NOD/SCID) con el mismo fenotipo histológico que en el tumor original.

Cox et al. identificaron pequeñas subfracciones de células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) humana que tenían los fenotipos CD34<sup>+</sup>/CD10<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>, y fueron capaz de injertar tumores de LLA en ratones inmunodeprimidos - es decir, las células madre de cáncer. A diferencia, no se observó injerto de los ratones usando la masa de LLA, a pesar de inyectar, en algunos casos, 10 veces más células. Véase Cox et al., "Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells", Blood 104(19): 2919-2925 (2004).

Se encontró que el mieloma múltiple contenía pequeñas subpoblaciones de células que eran CD138- y, con respecto a la gran población de masa de células de mieloma CD138+, tenía mayor potencial clonogénico y tumorigénico. Véase Matsui et al., "Characterization of clonogenic multiple myeloma cells", Blood 103(6): 2332. Los autores llegaron a la conclusión de que la subpoblación de CD138- de mieloma múltiple era la población de células madre de cáncer.

Kondo *et al.* aislaron una pequeña población de células de una línea celular de glioma C6, que se identificó como la población de células madre de cáncer en virtud de su capacidad para auto-renovarse y recapitular gliomas en ratones inmunodeprimidos. Véase Kondo et al., "Persistence of a small population of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:781-786 (2004). En este estudio, Kondo *et al.* determinaron que las líneas de células cancerosas contenían una población de las células madre cancerosas que conferirían la capacidad de la línea de injertar ratones inmunodeficientes.

Se mostró que los cánceres de mama contenían una pequeña población de células con características de célula madre (que llevan marcadores superficiales CD44+CD24<sup>low lin-</sup>). Véase Al-Hajj et al., "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983-3988 (2003). Tan solo 200 de estas células, correspondientes al 1-10 % de la población de células tumorales totales, son capaces de formar tumores en ratones NOD/SCID. A diferencia, la implantación de 20.000 células que carecieron de este fenotipo (es decir, la masa tumoral) era incapaz de volver a hacer crecer el tumor.

Se encontró que una subpoblación de células derivadas de tumores de próstata humana se auto-renovaba y recapitulaba el fenotipo del tumor de próstata del que se derivaban, constituyendo así la población de células madre de cáncer de próstata. Véase Collins et al., "Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells", Cancer Res 65(23):10946-10951 (2005).

Fang et al. aislaron una subpoblación de células de melanoma con propiedades de células madre de cáncer. En particular, esta subpoblación de células pudo diferenciarse y auto-renovarse. En cultivo, la subpoblación formó esferas, mientras que la fracción de células más diferenciadas de las lesiones fueron más adherentes. Además, la subpoblación que contenía células similares a esfera fue más tumorigénica que las células adherentes cuando se injertaron en ratones. Véase Fang et al., "A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas", Cancer Res 65(20): 9328-9337 (2005).

Singh et al. identificaron células madre de tumor cerebral. Cuando se aislaron y trasplantaron en ratones sin pelo, las células madre de cáncer CD133+, a diferencia de las células a granel de tumor CD133-, formaron tumores que pudieron entonces ser trasplantados en serie. Véanse Singh et al., "Identification of human brain tumor initiating cells", *Nature* 432:396-401 (2004); Singh et al., "Cancer stem cells in nervous system tumors", *Oncogene* 23:7267-7273 (2004); Singh et al., "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors", *Cancer Res.* 63:5821-5828 (2003).

Como las terapias contra el cáncer convencionales se dirigen a células que proliferan rápidamente (es decir, células que forman la masa tumoral), se cree que estos tratamientos son relativamente ineficaces en el direccionamiento y la alteración de células madre de cáncer. En realidad, las células madre de cáncer, que incluyen células madre de leucemia, han de hecho mostrado que son relativamente resistentes a terapias quimioterapéuticas convencionales (por ejemplo, Ara-C, daunorubicina), además de a terapias dirigidas más nuevas (por ejemplo, Gleevec®, Velcade®). Ejemplos de las células madre cancerosas de diversos tumores que son resistentes a quimioterapia, y el mecanismo por el que son resistentes, se describen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1:

Tipo de CSC	Resistencia	Mecanismo	Referencia
LMA	Ara-C	Quiescencia	Guzman. Blood '01
LMA	Daunorubicina	Salida de fármaco, antiapoptosis	Costello. Cancer Res '00
LMA	Daunorubicina, mitoxantrona	Salida de fármaco	Wulf. Blood '01
LMA		Quiescencia	Guan. Blood '03
LMA, SMD		Antiapoptosis	Suarez. Clin Cancer Res '04
LMC		Quiescencia	Holyoake. Blood '99
LMC	Gleevec®	Quiescencia	Graham. Blood '02
Mieloma	Velcade®		Matsui. ASH 04

Por ejemplo, las células madre leucémicas son de crecimiento relativamente lento o quiescentes, expresan genes multirresistentes, y utilizan otras características de mecanismos antiapoptóticos que contribuyen a su quimiorresistencia. Véase Jordan et al., "Targeting the most critical cells: approaching leukemia therapy as a problem in stem cell biology", *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2: 224-225 (2005). Además, las células madre cancerosas en virtud de su quimiorresistencia pueden contribuir al fracaso del tratamiento, y también pueden persistir en un paciente después de la remisión clínica y estas células madre cancerosas restantes pueden, por tanto, contribuir a la recaída en una fecha posterior. Véase Behbood et al., "Will cancer stem cells provide new therapeutic targets?" *Carcinogenesis* 26(4): 703-711 (2004). Por tanto, se espera que el direccionamiento de células madre cancerosas proporcione resultados a largo plazo mejorados para pacientes con cáncer. Por consiguiente, se necesitan nuevos agentes terapéuticos y/o regímenes diseñados para dirigir las células madre cancerosas para alcanzar este objetivo.

### **2.3 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Aproximadamente cuatro mil pacientes al año desarrollan leucemia mieloide aguda (LMA) en los EE.UU., Canadá y Europa. Véase, por ejemplo, Jamal et al., *Cancer Statistics* 56:106-130 (2006). La LMA es la leucemia más común en adultos y la segunda leucemia más común en niños. Las hospitalizaciones prolongadas, asociadas al tratamiento y complicaciones, representan una parte significativa de los costes sanitarios en estas regiones. Además, incluso con inducción de combinación y quimioterapia de consolidación, la mayoría de los pacientes recaen finalmente y mueren de su enfermedad o complicaciones del tratamiento. Véase, por ejemplo, Brune et al., "Improved leukemia-free survival after post-consolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase III trial", *Blood* 108(1):88-96 (2006). Se necesitan urgentemente novedosas terapias. El direccionamiento selectivo de células madre de células de LMA puede proporcionar una terapia segura y más eficaz.

### **2.4 SÍNDROME MIELODISPLÁSICO**

Hay aproximadamente 20.000 nuevos casos de síndrome mielodisplásico (SMD) cada año en los EE.UU. Los pacientes con síndromes mielodisplásicos normalmente tienen bajos recuentos sanguíneos en al menos uno o más de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Tras el examen, normalmente se encuentra que la médula ósea es displásica o hiperplásica, que significa que hay demasiadas células madre sanguíneas que funcionan mal en la médula ósea. Un pequeño porcentaje de pacientes con SMD tienen médula ósea hipoplásica, que significa que hay

muy pocas células madre sanguíneas en la médula ósea, que hacen que la enfermedad parezca similar a la anemia aplásica. Casi la mitad de las personas con SMD no tienen síntomas en el momento del diagnóstico. Cuando los signos y síntomas se producen, pueden incluir anemia, debilidad, fatiga, cefalea, moretones, elevado sangrado, urticaria, fiebres, llagas en la boca y enfermedad prolongada. El SMD se produce a una frecuencia cada vez mayor en personas mayores, pero puede producirse en niños también. En menos de un tercio de los pacientes, la SMD progresa con el tiempo para llegar a convertirse en leucemia aguda. La edad promedio de diagnóstico es 70 años de edad. Los tratamientos para el SMD pueden variar considerablemente, dependiendo del tipo de SMD, la historia del paciente, y la edad y capacidad para tolerar ciertos regímenes de tratamiento. Las opciones de tratamiento incluyen cuidado de apoyo, agentes relacionados con la quimioterapia y trasplante de células madre (que normalmente se usa solo en pacientes de menos de 50). Sin embargo, la tasa de remisión para los tratamientos existentes es relativamente baja, y se necesitan nuevas terapias.

## **2.5 INTERLEUCINA-3**

La interleucina-3 (IL-3) es una citocina que soporta la proliferación y diferenciación de progenitores mieloides y linfoides multi-potenciales y comprometidos. Véase, por ejemplo, Nitsche et al. "Interleukin-3 promotes proliferation and differentiation of human hematopoietic stem cells but reduces their repopulation potential in NOD/SCID mice", *Stem Cells* 21: 236-244 (2003). La interleucina-3 humana media en sus efectos uniéndose al receptor de IL-3 humana, que es una estructura heterodimérica y consiste en una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  de unión a IL-3. La subunidad  $\alpha$  es esencial para la unión al ligando y confiere especificidad sobre el receptor. La subunidad  $\beta$  también es compartida por el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y los receptores de IL-5, y se requiere para la unión al ligando de alta afinidad y la transducción de señales. La unión de IL-3 induce la heterodimerización de las subunidades de receptor  $\alpha$  y  $\beta$ . El receptor de IL-3 se expresa en exceso, con respecto a ciertas células hematopoyéticas normales, en múltiples cánceres hematológicos que incluyen LMA, leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (LLA-B), leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, y ciertos linfomas no Hodgkin agresivos (Munoz. *Haematologica* 86:1261-1269,2001; Riccioni. *Leuc Lymphoma* 46:303-311, 2005; Testa. *Leukemia* 18:219-226, 2004), además de en las células madre cancerosas de LMA, síndrome mielodisplásico (SMD), LLA de linfocitos T (LLA-T) y leucemia mieloide crónica (LMC) (véanse Jordan et al. "The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells", *Leukemia* 14:1777-1784 (2000); Florian et al. "Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38- stem cells in various myeloid malignancies", *Leuk. Lymphoma* 47:207-222 (2006); Lhermitte et al. "Most immature T-ALLs express Ra-IL3 (CD123): possible target for DT-IL3# therapy", 20:1908-1910 (2006); y Hogge et al. "Variant Diphtheria Toxin-Interleukin-3 Conjugates with Increased Receptor Affinity Have Enhanced Cytotoxicity against Acute Myeloid Leukemia Progenitors", *Clin. Cancer Res.* 12:1284-1291 (2004).

## **2.6 TOXINA DIFTÉRICA**

La toxina diftérica (DT) es una proteína de 535 aminoácidos con tres dominios que consiste en un dominio catalítico (aminoácidos 1-186) conectado por un bucle de disulfuro rico en arginina a un dominio de translocación (aminoácidos 187-388) y un dominio de unión a célula (aminoácidos 389-535; Figura 1). Véase, por ejemplo, Choe et al., "The crystal structure of diphtheria toxin", *Nature* 357: 216-222 (1992). La DT nativa se une al precursor de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina y CD9 en la superficie celular, experimenta endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, dinamina y ATP y, con acidificación del endosoma por ATPasa vesicular, el dominio de translocación de DT experimenta protonación de restos ácidos y la inserción espontánea en la membrana vesicular para formar canales de 18-22 Angstrom. El dominio catalítico se despliega y se escinde por furina en la vesícula y entonces el extremo C del dominio catalítico se transfiere a través del canal y se une a proteínas de coatómero, específicamente  $\beta$ -COP. La proteína disulfuro isomerasa reduce el enlace del dominio catalítico con el resto de DT y el péptido pasa al citosol. Hsp90 ayuda en el replegamiento. El fragmento de DT entonces ribosila con ADP el factor de elongación 2 conduciendo a la inactivación de la síntesis de proteínas y muerte celular (Figura 2). Véase Ratts et al., "A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 15635-15640 (2005).

## **2.7 CONJUGADOS DE TOXINA DIFTÉRICA RECOMBINANTES**

Los conjugados de proteína-toxina recombinantes representan una novedosa clase de agentes biológicos para oncología que se dirigen específicamente a receptores sobre las superficies de células cancerosas. Estos agentes normalmente consisten en una toxina truncada, que frecuentemente incluye los dominios catalítico y de translocación (pero no de unión a célula), fusionada a un ligando selectivo de célula que dirige la toxina a la diana prevista. Una tecnología tal implica a la toxina diftérica (DT) recombinante. La DT es una proteína de 535 aminoácidos con tres dominios que consisten en un dominio catalítico (aminoácidos 1-186) conectado con un bucle de disulfuro rico en arginina a un dominio de translocación (aminoácidos 187-388) y un dominio de unión a célula (aminoácidos 389-535; Figura 1). Véase, por ejemplo, Choe et al., "The crystal structure of diphtheria toxin", *Nature* 357: 216-222 (1992). La DT nativa se une al precursor de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina y CD9 sobre la superficie celular, experimenta endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, dinamina y ATP, y, con acidificación de endosoma por ATPasa vesicular, el dominio de translocación de DT experimenta la protonación de restos ácidos y la inserción espontánea en la membrana vesicular para formar canales de 18-22 Angstrom. El dominio catalítico se despliega y se escinde por furina en la vesícula y entonces el extremo C del

dominio catalítico se transfiere a través del canal y se une a  $\beta$ -COP. La proteína disulfuro isomerasa reduce el enlace del dominio catalítico con el resto de DT y el péptido pasa al citosol. Hsp90 ayuda en el replegamiento. El fragmento DT entonces ribosila con ADP el factor 2 de elongación conduciendo a la inactivación de la síntesis de proteínas y muerte celular (Figura 2). Véase Ratts et al., "A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol" *Proc Natl Acad Sci.*, 102: 15635-15640 (2005). Varios conjugados de DT recombinantes, que utilizan una forma truncada de DT, han sido expresados, purificados y probados en cultivo celular y se ha mostrado la toxicidad de células selectivas. Una toxina recombinante tal es el conjugado de DT<sub>388</sub>IL-3, en el que la DT truncada mantiene su dominio catalítico y de translocación, pero no su dominio de unión a célula.

Se construyó DT<sub>388</sub>IL-3 fusionando el gen que codifica los dominios catalítico y de translocación de DT (aminoácidos 1-388) mediante un conector Met-His con IL-3 humana. Véase, por ejemplo, "Diphtheria toxin fused to human interleukin-3 is toxic to blasts from patients with myeloid leukemias", *Leukemia* 14: 576-585 (2000). Se ha mostrado que DT<sub>388</sub>IL-3 es potente y selectivamente citotóxico para líneas celulares de LMA positivas para IL-3R y células de leucemia primaria derivadas de pacientes (véanse, Frankel et al., "Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor", *Protein Eng.* 13: 575-581 (2000); Alexander et al., "High affinity interleukin-3 receptor expression on blasts from patients with acute myelogenous leukemia correlates with cytotoxicity of a diphtheria toxin/IL-3 fusion protein", *Leuk. Res.* 25: 875-881 (2001); Alexander et al. "In vitro interleukin-3 binding to leukemia cells predicts cytotoxicity of a diphtheria toxin/IL-3 fusion protein", *Bioconj. Chem.* 11:564-568 (2000); Feuring-Buske et al. "A diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors", *Cancer Res.* 62: 1730-1736 (2002)). Estudios adicionales encontraron que las variantes de alta afinidad del compuesto DT<sub>388</sub>IL-3, llamadas DT388-IL3[K116W] (basándose en la mutación de una lisina en el aminoácido 116 a triptófano) y DT388IL3[Δ125-133] (basándose en una delección de aminoácidos 125-133 en el dominio de IL3), había aumentado la potencia contra células de leucemia (véanse, Hogge et al., "Variant diphtheria toxin-interleukin-3 conjugates with increased receptor affinity have enhanced cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitors", *Clin. Cancer Res.* 12: 1284-1291 (2006); Testa et al., "Diphtheria toxin fused to variant human interleukin-3 induces cytotoxicity of blasts from patients with acute myeloid leukemia according to the level of interleukin-3 receptor expression", *Blood* 106: 2527-2529 (2005)). DT<sub>388</sub>IL-3 también demostró eficacia antitumoral *in vivo* en ciertos modelos de ratón de leucemia humana (véanse, Black et al., "Diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein (DT388IL-3) prolongs disease-free survival of leukemic immuno-compromised mice", *Leukemia*; 17: 155-159 (2003); Feuring-Buske et al. "A diphtheria toxin-interleukin-3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors", *Cancer Res.* 62: 1730-1736 (2002); y Hogge et al., "The efficacy of diphtheria-growth factor fusion proteins is enhanced by co-administration of cytosine arabinoside in an immunodeficient mouse model of human acute myeloid leukemia" *Leuk Res* 28: 1221-1226 (2004)). La seguridad se mostró a dosis terapéuticamente activas en roedores y monos (véanse, Black et al., Black et al., "Diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein (DT388IL-3) prolongs disease-free survival of leukemic immuno-compromised mice", *Leukemia*; 17: 155-159 (2003); Cohen et al., "Toxicology and pharmacokinetics of DT388IL-3, a fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin (DT388) linked to human interleukin-3 (IL-3), in cynomolgus monkeys" *Leuk Lymph.* 45: 1647-1656 (2004); Cohen et al., "Safety evaluation of DT388IL-3, a diphtheria toxin-interleukin-3 fusion protein, in cynomolgus monkeys", *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 799-806 (2005)). Se prepararon lotes clínicos de DT<sub>388</sub>IL-3 y un IND obtenido (BB IND N.º 11314) (véase, Urieto et al., "Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT388IL-3 for phase I clinical trials", *Protein Exp. Purif.* 33: 123-133 (2004).

### 3. SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina-3 humana (IL-3)-toxina diftérica para su uso en un método de tratamiento de cáncer o síndrome mielodisplásico en un ser humano, en el que dicho método comprende la administración del conjugado de IL-3-toxina diftérica a una dosis de aproximadamente 4  $\mu$ g/kg, aproximadamente 4  $\mu$ g/kg a aproximadamente 12,5  $\mu$ g/kg, aproximadamente 4  $\mu$ g/kg a aproximadamente 20  $\mu$ g/kg, aproximadamente 5,3  $\mu$ g/kg, aproximadamente 7,1  $\mu$ g/kg, aproximadamente 9,4  $\mu$ g/kg o aproximadamente 12,5  $\mu$ g/kg por día, en la que dicho cáncer se caracteriza por células que expresan IL-3R. En un aspecto preferido de esta realización, se inhibe el crecimiento de células que expresan el receptor de interleucina-3.

Dentro del contexto de la invención, referencias en el presente documento a métodos de tratamiento de cáncer deben ser entendidos como referencias a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de interleucina-3 humana (IL-3)-toxina diftérica para su uso en un método de tratamiento de cáncer, como se ha definido anteriormente. Por consiguiente, aspectos y realizaciones referentes a métodos deben entenderse como aquellos referentes a una composición farmacéutica para su uso en el sentido anterior.

En esta o cualquiera de las realizaciones de la presente invención, el conjugado de interleucina-3-toxina diftérica puede comprender la interleucina-3 humana madura de longitud completa (que carece del péptido señal) conectada por un enlace covalente a toxina diftérica. Preferentemente, la toxina diftérica está modificada porque el dominio de unión a la superficie celular está delecionado. Por ejemplo, el conjugado es un conjugado químico en el que la porción de toxina diftérica (los dominios catalíticos y de translocación de toxina diftérica) y la porción de interleucina-3 están unidos químicamente juntos bien directamente o mediante un conector químico. Opcionalmente, el conjugado es uno genético recombinante en el que el conjugado se expresa como un único polipéptido. Cuando el

conjugado es un conjugado recombinante, el conjugado traducido comprende preferentemente los dominios catalítico y de translocación de toxina diftérica unidos mediante un enlace peptídico a la interleucina-3 humana. Lo más preferentemente, el conjugado comprende los aminoácidos 1-388 de toxina diftérica unidos mediante un conector peptídico a interleucina-3 humana.

5 En aspectos específicos de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 20 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 9 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. Además, el conjugado puede administrarse al menos dos veces a la semana o el conjugado puede administrarse al menos tres veces a la semana, al menos cuatro veces a la semana, al menos cinco veces a la semana, al menos seis veces a la semana, o siete veces a la semana. En un aspecto específico, donde el conjugado se administra más de una vez, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor cada vez. En particular, el conjugado puede administrarse durante un periodo de una o dos semanas o más. En aspectos donde se inhibe el crecimiento de células que expresan el receptor de interleucina-3, el crecimiento de las células pueden inhibirse al menos el 50 %, al menos el 65 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % en comparación con una muestra de referencia, es decir, una muestra de células no puesta en contacto con un conjugado de la invención.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método de inhibición del crecimiento de células que expresan el receptor de interleucina-3 que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal inhibición una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz en inhibir dichas células y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en que el conjugado se administra a una dosis mayor que 4 µg/kg por día, y en el que las células expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta realización, las células expresan tanto las subunidades alfa como beta del receptor de interleucina-3.

30 En aspectos específicos de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de más de 4 µg/kg por día a aproximadamente 20 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo superior a 4 µg/kg por día a aproximadamente 9 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. Además, el conjugado puede administrarse al menos dos veces a la semana o el conjugado puede administrarse al menos tres veces a la semana, al menos cuatro veces a la semana, al menos cinco veces a la semana, al menos seis veces a la semana, o siete veces a la semana. En un aspecto específico, donde el conjugado se administra más de una vez, el conjugado puede administrarse a una dosis superior a 4 µg/kg por día cada vez. En particular, el conjugado puede administrarse durante un periodo de dos semanas o más. En ciertos aspectos, el crecimiento de células que expresan el receptor de interleucina-3 puede inhibirse al menos el 50 %, al menos el 65 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % en comparación con una muestra de referencia, es decir, una muestra de células no puesta en contacto con un conjugado de la invención. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 12,5 µg/kg por día.

En otro aspecto más, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento, prevención y/o gestión de una enfermedad o trastorno que se muestra o se caracteriza por la expresión del receptor de interleucina-3 que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal tratamiento o prevención una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar, prevenir o gestionar la enfermedad o trastorno y un vehículo farmacéuticamente aceptable, con la condición de que la enfermedad o trastorno no sea leucemia mieloide aguda, y en el que las células expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta realización, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser la expresión en exceso de una o más subunidades del receptor de interleucina-3 en células que normalmente expresan el receptor de interleucina-3. En otro aspecto, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser expresión de receptor de interleucina-3 inapropiada en células que normalmente no expresan una o más subunidades del receptor de interleucina-3. En otro aspecto más, la enfermedad o trastorno que muestra o se caracteriza por la presencia o presencia en exceso de un tipo de célula que expresa una o más subunidades del receptor de interleucina-3. Enfermedades o trastornos a modo de ejemplo que pueden tratarse en esta realización de la invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades alérgicas o trastornos, enfermedades autoinmunitarias o trastornos, enfermedades inflamatorias o trastornos, o cánceres que no son leucemia mieloide aguda. En aspectos donde la enfermedad o trastorno es cáncer, el cáncer puede ser resistente, o multiresistente. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es SMD.

En otro aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento, prevención y/o gestión de una enfermedad o trastorno que se muestra o se caracteriza por expresión del receptor de interleucina-3 que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal tratamiento, prevención y/o gestión una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar, prevenir y/o gestionar la enfermedad o trastorno y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las células expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta realización, las células expresan tanto las subunidades alfa como beta del receptor de interleucina-3. En aspectos específicos de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 20 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 9 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. En un aspecto de esta realización, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser expresión en exceso de receptor de interleucina-3 sobre células que normalmente expresan el receptor de interleucina-3. En otro aspecto, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser la expresión de receptor de interleucina-3 inapropiada en células que normalmente no expresan el receptor de interleucina-3. En otro aspecto más, la enfermedad o trastorno que se muestra o se caracteriza por la presencia o presencia en exceso de un tipo de célula que expresa el receptor de interleucina-3. Enfermedades o trastornos a modo de ejemplo que pueden tratarse en esta realización de la invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades alérgicas o trastornos, enfermedades autoinmunitarias o trastornos, enfermedades inflamatorias o trastornos, o cánceres (incluyendo, sin limitación, leucemia mieloide aguda). En aspectos donde la enfermedad o trastorno es cáncer, el cáncer puede ser resistente, o multirresistente. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es SMD.

En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento, prevención y/o gestión del cáncer, método que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal tratamiento, prevención y/o gestión una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar, prevenir y/o gestionar el cáncer y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las células cancerosas expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, con la condición de que el cáncer no sea leucemia mieloide aguda. En otro aspecto más, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento o prevención de cáncer, que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal tratamiento o prevención una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar o prevenir el cáncer y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las células madre cancerosas expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, con la condición de que el cáncer no sea leucemia mieloide aguda.

En aspectos específicos de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 20 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 9 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. Además, el conjugado puede administrarse al menos dos veces a la semana o el conjugado puede administrarse al menos tres veces a la semana, al menos cuatro veces a la semana, al menos cinco veces a la semana, al menos seis veces a la semana, o siete veces a la semana. En un aspecto específico, donde el conjugado se administra más de una vez, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor cada vez. En particular, el conjugado puede administrarse durante un periodo de dos semanas o mayor. En otros aspectos, el crecimiento de las células cancerosas o las células madre cancerosas puede inhibirse al menos el 50 %, al menos el 65 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % en comparación con una muestra de referencia, es decir, una muestra de células no puesta en contacto con un conjugado de la invención.

En otros aspectos de estas realizaciones, el paciente humano puede estar en un estado de remisión del cáncer. En aún otros aspectos, el paciente humano ha sido previamente tratado con el conjugado o ha sido previamente tratado con agentes quimioterapéuticos convencionales o tiene radioterapia. En otro aspecto más, el paciente humano, concurrente con el tratamiento con compuestos de la invención, puede administrarse con un agente quimioterapéutico convencional o puede recibir radioterapia. En otros aspectos, el paciente humano no tiene niveles detectables de anticuerpos anti-toxina diftérica antes de la administración de un conjugado de la invención. En otro aspecto más, el método comprende además administrar un agente quimioterapéutico convencional. En aspectos particulares, el cáncer es un cáncer no hematológico. Además, el cáncer puede ser resistente o multirresistente.



En un aspecto específico, los métodos de esta realización pueden comprender además monitorizar la cantidad de células cancerosas o células madre cancerosas que expresan la subunidad alfa (en algunas realizaciones, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3 en una muestra derivada del ser humano después de la administración de un conjugado de la invención y determinar una evolución adicional del tratamiento basada en la cantidad de células cancerosas o las células madre cancerosas que expresan la subunidad alfa (en algunas realizaciones, las subunidades alfa y beta) presentes en la muestra en comparación con una muestra de referencia o una muestra de células cancerosas o las células madre cancerosas obtenidas del ser humano antes o durante la administración del conjugado.

En otro aspecto más, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento, prevención y/o gestión de leucemia mieloide que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal tratamiento, prevención y/o gestión una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar o prevenir leucemia mieloide y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado se administra a una dosis superior a 4 µg/kg, y en el que las células de leucemia mieloide expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3. En particular, la leucemia mieloide puede ser leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, o síndrome mielodisplásico. En algunos casos, la leucemia mieloide puede ser resistente y/o multirresistente. En ciertos aspectos de esta realización, las células de leucemia mieloide pueden expresar tanto las subunidades alfa como beta del receptor de interleucina-3.

En aspectos específicos de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 20 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 9 µg/kg por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg por día a aproximadamente 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 12,5 µg/kg por día. Además, el conjugado puede administrarse al menos dos veces a la semana o el conjugado puede administrarse al menos tres veces a la semana, al menos cuatro veces a la semana, al menos cinco veces a la semana, al menos seis veces a la semana, o siete veces a la semana. En un aspecto específico, donde el conjugado se administra más de una vez, el conjugado puede administrarse a una dosis superior a 4 µg/kg por día cada vez. En particular, el conjugado puede administrarse durante un periodo de dos semanas o mayor. En ciertos aspectos, la cantidad de células de leucemia mieloide puede disminuirse al menos el 50 %, al menos el 65 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % en comparación con una muestra de referencia, es decir, una muestra de células no puesta en contacto con un conjugado de la invención. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de aproximadamente 9 µg/kg por día.

En otros aspectos de estas realizaciones, el paciente humano puede estar en un estado de remisión de la leucemia mieloide. En aún otros aspectos, el paciente humano ha sido previamente tratado con el conjugado o ha sido previamente tratado con agentes quimioterapéuticos convencionales o radioterapia. En otro aspecto más, el paciente humano puede administrarse simultáneamente con un agente quimioterapéutico convencional o radioterapia. En otro aspecto más, el paciente humano se administra con el conjugado 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses después de recibir quimioterapia convencional. En otros aspectos, el paciente humano tiene bajos niveles o ningún nivel detectable de anticuerpos anti-toxina diftérica antes de la administración de un conjugado de la invención. En otro aspecto más, el método comprende además administrar un agente quimioterapéutico convencional.

En un aspecto específico, los métodos de esta realización pueden comprender además monitorizar la cantidad de células de leucemia mieloide que expresa las subunidades alfa y/o beta del receptor de interleucina-3 en una muestra derivada del ser humano después de la administración de un conjugado de la invención y determinar una evolución adicional del tratamiento basada en la cantidad de células de leucemia mieloide que expresan las subunidades alfa y/o beta presentes en la muestra en comparación con una muestra de referencia o una muestra de células de leucemia mieloide obtenida del ser humano antes o durante la administración del conjugado.

En un aspecto específico, los métodos de esta realización pueden comprender además monitorizar la cantidad de células de leucemia mieloide que expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3 en una muestra derivada del ser humano después de la administración de un conjugado de la invención y determinar una evolución adicional del tratamiento basada en la cantidad de células de leucemia mieloide que expresan la subunidad alfa presente en la muestra en comparación con una muestra de referencia o una muestra de células de leucemia mieloide obtenida del ser humano antes o durante la administración del conjugado.

La presente divulgación también se refiere a un método de prevención de una recaída de cáncer en un ser humano previamente tratados para el cáncer, que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal prevención que había sido previamente tratado para el cáncer, con una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída del cáncer y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las células cancerosas o las células madre cancerosas expresan las

subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, con la condición de que el cáncer no sea leucemia mieloide. En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de prevención de una recaída de leucemia mieloide en un ser humano previamente tratado para leucemia mieloide, que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal prevención que había sido previamente tratado para el leucemia mieloide una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída de leucemia mieloide y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado se administra a una dosis superior a 4 µg/kg por día.

En otra realización más, se proporciona un método de prevención de una recaída de cáncer en un ser humano en remisión de tal cáncer, método que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal prevención que está en remisión de dicho cáncer una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída del cáncer y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las células cancerosas o las células madre cancerosas expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, con la condición de que el cáncer no sea leucemia mieloide. Otra realización de la invención se refiere a un método de prevención de una recaída de leucemia mieloide en un ser humano en remisión de la leucemia mieloide, que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal prevención que está en remisión de leucemia mieloide una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída de leucemia mieloide y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en que el conjugado se administra a una dosis superior a 4 µg/kg.

La presente divulgación también se refiere a un método de purga de la médula ósea o sangre periférica antes del trasplante autólogo de células madre, que comprende poner en contacto *ex vivo* médula ósea o sangre periférica obtenida de un ser humano con una composición que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para purgar significativamente la médula ósea o sangre periférica de células que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta realización, la cantidad de médula ósea o células de sangre periférica que expresan una subunidad beta del receptor de interleucina-3 después de poner en contacto con un conjugado de la invención puede disminuirse al menos el 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, o al menos el 99 %. La presente divulgación también se refiere a un método de realización de un trasplante autólogo de médula ósea o células madre de sangre periférica, que comprende administrar a un ser humano una cantidad de médula ósea significativamente purgada o sangre periférica eficaz para reconstituir la función hematopoyética en dicho ser humano, en el que dicha médula ósea purgada o sangre periférica es médula ósea o sangre periférica obtenida de dicho ser humano previamente puesto en contacto con una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para purgar significativamente la médula ósea o sangre periférica de células que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3. Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende médula ósea o sangre periférica purgada, en la que dicha médula ósea o sangre periférica purgada es médula ósea o sangre periférica obtenida de un ser humano y se pone en contacto *ex vivo* con una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para purgar significativamente la médula ósea o sangre periférica de células que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, y entonces posiblemente reintroducir la médula ósea o células de sangre periférica de nuevo en el paciente. En un aspecto, la composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones de la invención, pueden usarse secuencialmente quimioterapia convencional y los métodos de la invención. En un aspecto específico de esta realización, los blastos de leucemia del paciente se reducen primero por el uso de quimioterapia convencional, seguido de un régimen que comprende la administración de una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para estabilizar, reducir o erradicar significativamente las células madre cancerosas que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3.

### 3.1 DEFINICIONES

Como se usa en el presente documento, el término "agente" se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia para su uso en la prevención, tratamiento, gestión y/o diagnóstico de cáncer, que incluye el conjugado de toxina diftérica-interleucina-3 de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado de la invención" se refiere a interleucina-3 o una porción, análogo o derivado de la misma que se une al receptor de interleucina-3 o subunidad del mismo conjugado con toxina diftérica, una porción de la misma o un análogo de la misma. A menos que se indique lo contrario, los términos "compuesto de la invención" y "composición de la invención" se usan como alternativas para el término "conjugado de la invención".

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad", como se usa en el contexto de la cantidad de una población de células particular o células, se refiere a la frecuencia, cantidad, porcentaje, cantidad relativa o número de población de células particular o células.

Como se usa en el presente documento, los términos "alrededor de" o "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario, se refieren a un valor que es no superior al 10 % por encima o por debajo del valor que está modificado por el término.

5 Como se usa en el presente documento, el término "significativamente", como se usa en el contexto de purga de la médula ósea o sangre periférica de células que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, se refiere a una disminución en las células que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3 de al menos el 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, o el 99 %.

10 Como se usa en el presente documento, el término "pequeña reducción", en el contexto de una población de células particular (por ejemplo, células endoteliales circulantes y/o progenitores endoteliales circulantes) se refiere a menos del 30 % de reducción en la población de células (por ejemplo, la población de células endoteliales circulantes y/o la población de progenitores endoteliales circulantes).

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente de diagnóstico" se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se usa con el fin de diagnosticar cáncer. Ejemplos no limitantes de agentes de diagnóstico incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, u otras proteínas, que incluyen aquellas conjugadas con un agente detectable. Como se usa en el presente documento, el término "agentes detectables" se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que es detectable por cualquier metodología disponible para un experto en la materia. Ejemplos no limitantes de agentes detectables incluyen colorantes, gases, metales o radioisótopos. Como se usa en el presente documento, agente de diagnóstico y "agente de obtención de imágenes" son términos equivalentes.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "agente profiláctico" se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se usa con el fin para prevenir el cáncer. Ejemplos de agentes profilácticos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, inmunoglobulinas (por ejemplo, Ig multi-específicas, Ig monocatenarias, fragmentos de Ig, anticuerpos policlonales y sus fragmentos, anticuerpos monoclonales y sus fragmentos), proteínas de unión, agentes quimioespecíficos, agentes quimiotóxicos (por ejemplo, agentes antineoplásicos), terapia basada en  
25 proliferación y fármacos de molécula pequeña.

30 Como se usa en el presente documento, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se usa con el fin para tratar y/o gestionar una enfermedad o trastorno. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, inmunoglobulinas (por ejemplo, Ig multi-específicas, Ig monocatenarias, fragmentos de Ig, anticuerpos policlonales y sus fragmentos, anticuerpos monoclonales y sus fragmentos), péptidos (por ejemplo, receptores de péptido, selectinas), proteínas de unión, productos biológicos, agentes quimioespecíficos, agentes quimiotóxicos (por ejemplo, agentes antineoplásicos), terapia basada en proliferación, radiación, quimioterapia, agentes antiangiogénicos y fármacos de molécula pequeña.

35 Como se usa en el presente documento, el término "terapia basada en proliferación" se refiere a cualquier molécula, compuesto, sustancia y/o método que altere, inhiba o destruya diferencialmente poblaciones de células rápidamente en proliferación (por ejemplo, células cancerosas) en comparación con poblaciones de células que se dividen más lentamente. Las terapias basadas en proliferación pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas terapias quimioterapéuticas y radioterapias que normalmente se usan en oncología. Un agente basado en proliferación puede alterar, inhibir o destruir diferencialmente células rápidamente en proliferación por cualquier mecanismo conocido para un experto en la materia que incluye, pero no se limita a, alterar la función de ADN (que incluye replicación de ADN), interferir con enzimas implicadas en la reparación de ADN, intercalar ADN, interferir con la transcripción o traducción de ARN, interferir con enzimas implicadas con la replicación de ADN, interferir con una topoisomerasa, tal como topoisomerasa II, interferir con la mitosis, e inhibir enzimas necesarias para la síntesis de proteínas necesarias para la replicación celular. Ejemplos específicos de terapias basadas en proliferación incluyen, pero no se limitan a,  
40 agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos, procarbazona, hidroxurea, agentes basados en platino, antraciclina, inhibidores de la topoisomerasa II, venenos del huso e inhibidores mitóticos.  
45

50 Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una neoplasia o tumor resultante del crecimiento incontrolado anormal de células. Ejemplos no limitantes incluyen aquellos cánceres descritos en la Sección 5.3.2. El término "cáncer" engloba una enfermedad que implica tanto a células cancerosas pre-malignas como malignas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un crecimiento en exceso localizado de células que no han diseminado a otras partes de un sujeto, es decir, un tumor localizado, o a veces benigno. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido o destruido estructuras del cuerpo vecinas y ha diseminado a sitios distantes. En aún otras realizaciones, el cáncer está asociado a un antígeno de cáncer específico.

55 Como se usa en el presente documento, el término "células cancerosas" se refieren a células que adquieren un conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, que incluye la capacidad de evadir la apoptosis, auto-suficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, invasión/metástasis de tejidos, potencial significativo de crecimiento y/o angiogénesis sostenida. El término "célula cancerosa" se indica para englobar tanto las células cancerosas pre-malignas como malignas.

Como se usa en el presente documento, el término "célula(s) madre de cáncer" se refiere a una célula que puede ser un progenitor de una célula cancerosa altamente proliferativa. Una célula madre de cáncer tiene la capacidad de volver a hacer crecer un tumor como se demuestra por su capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos, y normalmente para formar tumores tras el posterior trasplante en serie en ratones inmunodeprimidos. Las células madre de cáncer también están normalmente creciendo lentamente con respecto a la masa de un tumor; es decir, las células madre cancerosas son generalmente quiescentes. En ciertas realizaciones, pero no todas, la célula madre de cáncer puede representar aproximadamente del 0,1 al 10 % de un tumor.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para producir la prevención del desarrollo, reaparición o aparición del cáncer y uno o más síntomas del mismo, para potenciar o mejorar el (los) efecto(s) profiláctico(s) de otra terapia, reducir la gravedad, la duración del cáncer, mejorar uno o más síntomas del cáncer, prevenir el avance del cáncer, producir la regresión del cáncer y/o potenciar o mejorar el (los) efecto(s) terapéutico(s) de otra terapia. En una realización de la invención, la cantidad de una terapia es eficaz para lograr uno, dos, tres o más resultados tras la administración de una, dos, tres o más terapias: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre de cáncer; (2) una estabilización, reducción o eliminación en la población de células cancerosas; (3) una estabilización o reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) una alteración en la formación de un tumor; (5) erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción en la mortalidad; (7) un aumento en la duración, o tasa, de la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global; (8) un aumento en la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución en la tasa de hospitalizaciones, (10) una disminución en las duraciones de hospitalización, (11) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, preferentemente menos del 2 %, (12) un aumento en el número de pacientes en remisión, (13) un aumento en la longitud o duración de la remisión, (14) una disminución en la tasa de reaparición de cáncer, (15) un aumento en el tiempo hasta la reaparición del cáncer, y (16) una mejora de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ser humano anciano" se refiere a un ser humano entre 65 años de edad o mayor, preferentemente 70 años de edad o mayor.

Como se usa en el presente documento, la expresión "adulto humano" se refiere a un ser humano de 18 años de edad o mayor.

Como se usa en el presente documento, la expresión "niño humano" se refiere a un ser humano de entre 24 meses de edad y 18 años de edad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "lactante humano" se refiere a un ser humano de menos de 24 meses de edad, preferentemente menos de 12 meses de edad, menos de 6 meses de edad, menos de 3 meses de edad, menos de 2 meses de edad, o menos de 1 mes de edad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "paciente humano" se refiere a cualquier ser humano, tanto anciano, adulto, niño como lactante.

Como se usa en el presente documento, el término "resistente" se determina casi siempre por el fracaso a alcanzar el criterio de valoración clínico, por ejemplo, respuesta, duración de respuesta prolongada, supervivencia sin enfermedad prolongada, recaída sin supervivencia, supervivencia sin progresión y supervivencia global. Otra forma de definir que es resistente a una terapia es que un paciente ha dejado de lograr una respuesta a una terapia de forma que se determina que la terapia no es terapéuticamente eficaz.

Como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente a un antígeno" y términos análogos se refiere a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno o un fragmento y no se unen específicamente a otros antígenos. Un péptido, polipéptido, proteína o anticuerpo que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos, polipéptidos o proteínas con afinidad más baja como se ha determinado por, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. Anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un antígeno pueden ser reactivos de forma cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos. Un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando se une al antígeno con afinidad más alta que a cualquier antígeno reactivo de forma cruzada como se determina usando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Véase, por ejemplo, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology, 2nd ed., Raven Press, New York, en las páginas 332-336 para una discusión referente a la especificidad del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término "en combinación" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere al uso de más de una terapia (por ejemplo, profiláctica y/o terapéutica). El uso del término "en combinación" no limita el orden en el que las terapias (por ejemplo, una primera y segunda terapia) se administran a un sujeto. Una terapia puede administrarse antes de (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana,

2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con, o posterior a (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia a un sujeto que tenía, tiene o es susceptible al cáncer. Las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que las terapias puedan actuar juntas. En una realización particular, las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que proporcionen un aumento del beneficio que si se administraron de otro modo. Cualquier terapia adicional puede administrarse en cualquier orden con la otra terapia adicional.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "gestionan", "gestionar" y "gestión" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto deriva de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) o una combinación de terapias, mientras que no produce una cura de cáncer. En ciertas realizaciones, un sujeto se administra con una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) para "gestionar" el cáncer para prevenir la progresión o empeoramiento de la afección.

15 Como se usa en el presente documento, el término "marcador" en el contexto de una célula o tejido (por ejemplo, una célula normal o cancerosa o tumor) significa cualquier antígeno, molécula u otra entidad química o biológica que se encuentra específicamente en o sobre un tejido que se desea identificar o se identifica en o sobre un tejido particular afectado por una enfermedad o trastorno. En realizaciones específicas, el marcador es un antígeno de superficie celular que se expresa diferencialmente o preferencialmente por tipos específicos de células. Por ejemplo, una célula madre de cáncer de leucemia expresa diferencialmente CD123 con respecto a una célula madre hematopoyética normal.

20 Como se usa en el presente documento, el término "fenotipo de marcador" en el contexto de un tejido (por ejemplo, una célula normal o cancerosa o una célula tumoral) significa cualquier combinación de antígenos (por ejemplo, receptores, ligandos, y otros marcadores superficiales de célula), moléculas, u otras entidades químicas o biológicas que se encuentran específicamente en o sobre un tejido que se desea para identificar un tejido particular afectado por una enfermedad o trastorno. En realizaciones específicas, el fenotipo de marcador es un fenotipo de superficie celular. Según esta realización, el fenotipo de superficie celular puede determinarse detectando la expresión de una combinación de antígenos de superficie celular. Ejemplos no limitantes de fenotipos de superficie celular de las células madre cancerosas de ciertos tipos de tumor incluyen CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, CD123<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD10<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>, CD138<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>/RC2<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>/α<sub>2</sub>β<sub>1</sub><sup>hi</sup>/CD133<sup>+</sup>, CLL-1, SLAMs, y otros fenotipos de superficie de célula madre de cáncer mencionados en el presente documento, además de aquellos que se conocen en la técnica.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerado en la farmacopea estadounidense, farmacopea europea, u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos.

30 Como se usa en el presente documento, los términos "previenen", "prevenir" y "prevención", en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto, se refieren a la prevención o inhibición de la reaparición, aparición y/o desarrollo de un cáncer o un síntoma del mismo en un sujeto resultante de la administración de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), o una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos). En algunas realizaciones, tales términos se refieren a uno, dos, tres o más resultados tras la administración de una o más terapias: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre de cáncer, (2) una estabilización, reducción o eliminación en la población de células cancerosas, (3) un aumento en la tasa de respuesta, (4) un aumento en la longitud o duración de la remisión, (5) una disminución en la tasa de reaparición del cáncer, (6) un aumento en el tiempo hasta la reaparición del cáncer, (7) un aumento en la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global del paciente, y (8) una mejora de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida. En realizaciones específicas, tales términos se refieren a una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre de cáncer.

35 Como se usa en el presente documento, los términos "fragmento" y "porción" en el contexto de agentes proteínicos se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos contiguos, al menos 10 restos de aminoácidos contiguos, al menos 15 restos de aminoácidos contiguos, al menos 20 restos de aminoácidos contiguos, al menos 25 restos de aminoácidos contiguos, al menos 40 restos de aminoácidos contiguos, al menos 50 restos de aminoácidos contiguos, al menos 60 restos de aminoácidos contiguos, al menos 70 restos de aminoácidos contiguos, al menos 80 restos de aminoácidos contiguos, al menos 90 restos de aminoácidos contiguos, al menos 100 restos de aminoácidos contiguos, al menos 125 restos de aminoácidos contiguos, al menos 150 restos de aminoácidos contiguos, al menos 175 restos de aminoácidos contiguos, al menos 200 restos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 restos de aminoácidos contiguos de una proteína o polipéptido.

40 Como se usa en el presente documento, el término "intervalo de referencia predeterminado" se refiere a un intervalo de referencia para la entidad biológica particular, por ejemplo, célula madre de cáncer, para un sujeto o una

población de sujetos. Cada laboratorio puede establecer su propio intervalo de referencia para cada ensayo particular, o puede ponerse a disposición un intervalo de referencia estándar para cada ensayo y usarse localmente, regionalmente, nacionalmente, o mundialmente, o puede ser específico de paciente. En una realización específica, el término se refiere a un intervalo de referencia para la cantidad de células madre cancerosas en un paciente (por ejemplo, como se ha determinado por obtención de imágenes *in vivo*) o un espécimen de un paciente. En otra realización específica, el término se refiere a un intervalo de referencia para la cantidad de células cancerosas en un paciente (por ejemplo, como se describe por obtención de imágenes *in vivo*) o un espécimen de un paciente.

Como se usa en el presente documento, el término "régimen profilácticamente eficaz" se refiere a un régimen eficaz para dosificar, cronometrar, frecuencia y duración de la administración de una o más terapias para la prevención de cáncer o un síntoma del mismo. En una realización específica, el régimen logra uno, dos, tres, o más de los siguientes resultados: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre de cáncer, (2) una estabilización, reducción o eliminación en la población de células cancerosas, (3) un aumento en la tasa de respuesta, (4) un aumento en la longitud o duración de la remisión, (5) una disminución en la tasa de reaparición del cáncer, (6) un aumento en el tiempo hasta la reaparición del cáncer, (7) un aumento en la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global del paciente, y (8) una mejora de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida.

Como se usa en el presente documento, el término "estabilizar" y términos análogos, cuando se usa en el contexto de una población de células madre de cáncer o población de células cancerosas, se refiere a la prevención de un aumento en la población de células madre de cáncer o población de células cancerosas, respectivamente. En otras palabras, la cantidad de células madre cancerosas o la cantidad de células cancerosas de la que está compuesta un cáncer se mantiene, y no aumenta, o aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %.

Como se usa en el presente documento, el término "régimen terapéuticamente eficaz" se refiere a un régimen para dosificar, cronometrar, frecuencia y duración de la administración de una o más terapias para el tratamiento y/o gestión del cáncer o un síntoma del mismo. En una realización específica, el régimen logra uno, dos, tres, o más de los siguientes resultados: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre de cáncer; (2) una estabilización, reducción o eliminación en la población de células cancerosas; (3) una estabilización o reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) una alteración en la formación de un tumor; (5) erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción en la mortalidad; (7) un aumento en la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global, duración, o tasa; (8) un aumento en la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución en la tasa de hospitalizaciones, (10) una disminución en las duraciones de hospitalización, (11) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, preferentemente menos del 2 %, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión.

Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono y ser humano), y lo más preferentemente un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal no humano tal como un animal de granja (por ejemplo, un caballo, cerdo, o vaca) o una mascota (por ejemplo, un perro o gato). En una realización específica, el sujeto es un ser humano anciano. En otra realización, el sujeto es un adulto humano. En otra realización, el sujeto es un ser niño humano. En otra realización más, el sujeto es un ser humano lactante.

Como se usa en el presente documento, los términos "terapias" y "terapia" pueden referirse a cualquier método, composición y/o agente que puede usarse en la prevención, tratamiento y/o gestión de un cáncer o uno o más síntomas del mismo. En ciertas realizaciones, los términos "terapia" y "terapias" se refieren a quimioterapia, terapia de molécula pequeña, radioinmunoterapia, terapia con toxinas, terapia de enzimas activantes de profármacos, terapia biológica, terapia con anticuerpos, terapia quirúrgica, terapia con hormonas, inmunoterapia, terapia antiangiogénica, terapia dirigida, terapia epigenética, terapia de desmetilación, terapia con inhibidores de histona desacetilasa, terapia de diferenciación, radioterapia, o una combinación de las terapias anteriores y/u otras útiles en la prevención, gestión y/o tratamiento de un cáncer o uno o más síntomas del mismo.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratar" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refieren a la reducción o inhibición de la progresión y/o duración del cáncer, la reducción o mejora de la gravedad del cáncer, y/o la mejora de uno o más síntomas del mismo, resultante de la administración de una o más terapias. En realizaciones específicas, tales términos se refieren a uno, dos o tres o más resultados tras la administración de uno, dos, tres o más terapias: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre de cáncer; (2) una estabilización, reducción o eliminación en la población de células cancerosas; (3) una estabilización o reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) una alteración en la formación de un tumor; (5) erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción en la mortalidad; (7) un aumento en la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global, duración, o tasa; (8) un aumento en la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución en la tasa de hospitalizaciones, (10) una disminución en las duraciones de hospitalización, (11) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o

5 aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, preferentemente  
 10 menos del 2 %, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión. En ciertas realizaciones, tales términos  
 se refieren a una estabilización o reducción en la población de células madre de cáncer. En algunas realizaciones,  
 tales términos se refieren a una estabilización o reducción en el crecimiento de células cancerosas. En algunas  
 realizaciones, tales términos se refieren a una estabilización o reducción en la población de células madre de cáncer  
 y una reducción en la población de células cancerosas. En algunas realizaciones, tales términos se refieren a una  
 estabilización o reducción en el crecimiento y/o formación de un tumor. En algunas realizaciones, tales términos se  
 refieren a la erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional o metastásico (por ejemplo, la  
 minimización o retraso de la diseminación de cáncer). En algunas realizaciones, tales términos se refieren a una  
 reducción en la mortalidad y/o un aumento en la tasa de supervivencia de una población de pacientes. En  
 realizaciones adicionales, tales términos se refieren a un aumento en la tasa de respuesta, la durabilidad de la  
 respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión. En algunas realizaciones, tales términos se  
 refieren a una disminución en la tasa de hospitalizaciones de una población de pacientes y/o una disminución en la  
 duración de hospitalizaciones para una población de pacientes.

15 Concentraciones, cantidades, cifras de células, porcentajes y otros valores numéricos pueden presentarse en el  
 presente documento en un formato de intervalo. Debe entenderse que tal formato de intervalo se usa simplemente  
 por comodidad y brevedad y debe interpretarse flexiblemente para incluir no solo los valores numéricos  
 explícitamente citados como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos  
 20 individuales o sub-intervalos englobados dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y sub-intervalo se  
 citara explícitamente.

#### 4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1.** Un modelo de la estructura tridimensional de la toxina diftérica (DT) basada en las coordenadas  
 cristalográficas de rayos X. Se muestra el esqueleto de carbono alfa con flechas planas para las hojas beta y  
 cilindros para las hélices alfa. Se muestran los dominios catalítico, de translocación y de unión a receptor.
- 25 **Figura 2.** Mecanismo de intoxicación de células por DT. Las etapas incluyen (a) unión a célula, (b) endocitosis  
 mediada por receptor, (c) bajo pH, furina y tiorredoxina reductasa, beta-COP y translocación mediada por Hsp90, (d)  
 replegamiento y ribosilación por ADP de EF2, y (e) muerte celular. (Ratts et al., "A conserved motif in  
 transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol", Proc. Natl. Acad. Sci.  
 U.S.A.102:15635-15640 (2005).
- 30 **Figura 3.** Un modelo de DT<sub>388</sub>IL-3. Esqueleto de carbono alfa mostrado con azul para el dominio catalítico de DT,  
 verde para el dominio de translocación de DT y blanco para IL-3. Modelo basado en las coordenadas de rayos X  
 para DT e IL-3 humana. (Choe et al., "The crystal structure of diphtheria toxin", Nature 357:216-222 (1992).
- Figura 4.** Una fotomicrografía de una biopsia de médula ósea de un paciente, antes del tratamiento (A) y dos meses  
 después del tratamiento (B). Wright-Giemsa teñido a 400x aumentos.
- 35 **Figura 5.** Gráfico que muestra el porcentaje de pacientes con grado 2 o toxicidades relacionadas con el fármaco  
 más bajas para DT<sub>388</sub>IL-3 a propósito del Ejemplo 2, abajo.
- Figura 6A-B.** Gráfico que muestra los niveles en suero de DT<sub>388</sub>IL-3 en el día 1 (A) y día 12 (B) a propósito del  
 Ejemplo 2, abajo.
- 40 **Figuras 7A-C.** Farmacocinética y respuesta inmunitaria a propósito del Ejemplo 2, abajo. **Figura 7A:** C<sub>máx</sub> (µg/ml)  
 en función de la dosis (µg/kg). **Figura 7B:** C<sub>máx</sub> en el día 12 frente a C<sub>máx</sub> en el día 1, que muestra la relación  
 entre C<sub>máx</sub> en la primera y última dosis. **Figura 7C:** DT<sub>388</sub>IL-3 en suero pico (µg/ml) frente al anticuerpo anti-toxina  
 diftérica (anti-DT) en suero pretratamiento (µg/ml), que muestra la relación entre el fármaco pico y los niveles de  
 anticuerpo pretratamiento.
- 45 **Figura 8A:** Una fotomicrografía de pre- y post-aspirado de médula ósea del paciente N.º 19 a propósito de la  
 Ejemplo 2, abajo. **Figura 8B:** Recuentos de sangre para el paciente N.º 19 a propósito del Ejemplo 2, abajo. **Figura**  
**8C:** Una fotomicrografía de pre- y post-aspirado de médula ósea del paciente N.º 36 a propósito del Ejemplo 2,  
 abajo. **Figura 8D:** Recuentos de sangre para el paciente N.º 36 a propósito del Ejemplo 2, abajo.

#### 5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina-3  
 humana (IL-3)-toxina diftérica para su uso en un método de tratamiento de cáncer o síndrome mielodisplásico en un  
 ser humano, en el que dicho método comprende la administración del conjugado de IL-3-toxina diftérica a una dosis  
 de aproximadamente 4 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg a aproximadamente 12,5 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg  
 a aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 5,3 µg/kg, aproximadamente 7,1 µg/kg, aproximadamente 9,4 µg/kg  
 o aproximadamente 12,5 µg/kg por día, en el que dicho cáncer se caracteriza por células que expresan IL-3R. Otros  
 55 métodos incluyen tratar, prevenir y/o gestionar una enfermedad o trastorno que muestra o se caracteriza por células  
 que expresan el receptor de interleucina-3 administrando a un ser humano en necesidad de tal tratamiento,

prevención y/o gestión de una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3 humana-toxina diftérica eficaz en inhibir dichas células y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que las células expresan la subunidad alfa (en realizaciones específicas, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria y enfermedad alérgica. La presente invención también se refiere a métodos de purga de la médula ósea o sangre periférica, poniendo en contacto *ex vivo* la médula ósea o muestra de sangre periférica obtenida de un ser humano con una composición que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para purgar significativamente la médula ósea o sangre periférica de células que expresan la subunidad alfa (en realizaciones específicas, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método de realización de un trasplante de médula ósea autólogo administrando de nuevo al paciente tal médula ósea o sangre periférica purgada, además de composiciones que comprenden tal médula ósea o sangre periférica purgada, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### 5.1 CONJUGADO DE INTERLEUCINA-3-TOXINA DIFTÉRICA

En una realización, un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica de la presente invención comprende la proteína interleucina-3 (IL-3) madura (que carece del péptido señal) de longitud completa, o una porción, análogo o derivado de la misma, que se une al receptor de interleucina-3 o una subunidad de la misma sobre una superficie celular, conjugado mediante una tecnología recombinante o mediante enlace químico (covalente) a toxina diftérica, o una porción, análogo o derivado de la misma, toxina que carece preferentemente del dominio de unión a célula nativo. En una realización preferida, IL-3 es IL-3 humana. En ciertas realizaciones, el conjugado comprende los dominios catalítico y de translocación de la toxina diftérica fusionados mediante un enlace covalente con IL-3 humana. En otras realizaciones, la toxina diftérica está unida mediante un conector peptídico a la porción de IL-3 humana del conjugado. El conector para el conjugado puede ser de dos, tres, cinco, diez o quince aminoácidos de longitud. La longitud del conector puede variar para proporcionar unión óptima del conjugado. En un aspecto preferido, el conector peptídico tiene dos a cuatro aminoácidos de longitud. En un aspecto más específico, el conector peptídico es un conector Met-His. Aunque no se pretende quedar ligado por un mecanismo de acción particular, el conector peptídico flexible facilita el emparejamiento de cadenas y minimiza el posible replegamiento. Las moléculas de conector son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo et al., 1998, Clin. Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50, cada uno incorporado por referencia en sus totalidades.

En otras realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según la presente invención, el conjugado puede comprender cualquier dominio de DT unido mediante cualquier molécula de conector conocida en la técnica a cualquier dominio de IL-3. En una realización específica, el conjugado es DT<sub>388</sub>IL-3 (Figura 3), que es una proteína de fusión que comprende los aminoácidos 1-388 fusionados con IL-3 humana madura de longitud completa, mediante un conector de aminoácidos Met-His.

La toxina diftérica (DT) es una proteína de 535 aminoácidos con tres dominios que consiste en un dominio catalítico (aminoácidos 1-186) conectado por un bucle de disulfuro rico en arginina a un dominio de translocación (aminoácidos 187-388), seguido de un dominio de unión a célula (aminoácidos 389-535; Figura 1). Véase, por ejemplo, Choe et al., "The crystal structure of diphtheria toxin", Nature 357:216-222 (1992). La secuencia de aminoácidos de DT puede encontrarse en la base de datos GenBank (véase, por ejemplo, el N.º de acceso AAN28949). Fragmentos, análogos y derivados de toxina diftérica pueden ser útiles en la presente solicitud. En algunas realizaciones, el conjugado de la invención consiste en los dominios catalíticos, de translocación y de unión a célula de DT. En otras realizaciones, el conjugado consiste en los dominios de unión a célula y catalítico de DT. En aún otras realizaciones, el conjugado de la invención consiste en los dominios de unión a célula y catalítico de DT. En realizaciones preferidas, el conjugado de la invención consiste en los dominios catalítico y de translocación de DT. En algunas realizaciones, el conjugado de la invención comprende uno de cualquiera del dominio de translocación, catalítico o de unión a célula.

Fragmentos, análogos y derivados de IL-3 pueden ser útiles en la presente invención a condición de que cuando se fusionen con la porción de toxina diftérica del conjugado, tales fragmentos, análogos y derivados mantengan la capacidad de unirse a una subunidad del receptor de IL-3 o el receptor de IL-3 nativo expresado sobre la superficie de una célula. Preferentemente, la unión cinética de los fragmentos, análogos o derivados sigue siendo la misma o varía solo no más del 25 %. El polipéptido IL-3 puede ser de cualquier especie. Las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos de los polipéptidos IL-3 pueden encontrarse en la bibliografía o bases de datos públicas, o las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos pueden determinarse usando técnicas de clonación y secuenciación conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, la IL-3 es una IL-3 de mamífero. En una realización preferida, un polipéptido IL-3 es IL-3 humana, un análogo, derivado, o un fragmento de la misma. La secuencia de aminoácidos de IL-3 humana puede encontrarse en la base de datos GenBank (véase, por ejemplo, el N.º de acceso AAC08706).

En una realización de la invención, un polipéptido IL-3 comprende una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácidos conservativa, pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos



conservativas, incluso más preferentemente no más de 40 sustituciones de aminoácidos conservativas, todavía más preferentemente no más de 30 sustituciones de aminoácidos conservativas, y todavía incluso más preferentemente no más de 20 sustituciones de aminoácidos conservativas, con respecto a la secuencia de aminoácidos de IL-3 nativa (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana nativa), que produce un cambio silencioso, es decir, ningún cambio en la actividad. En otra realización de la invención, un polipéptido de IL-3 comprende una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácidos conservativa; pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a la secuencia de aminoácidos de IL-3 nativa (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana nativa), que produce un cambio silencioso. En otra realización más, un polipéptido de IL-3 comprende una secuencia de aminoácidos que contiene una o más sustituciones conservativas o una combinación de sustituciones de aminoácidos no conservativas y conservativas con respecto a la secuencia de aminoácidos de IL-3 nativa, que produce un cambio silencioso.

Para mejorar o alterar las características de los polipéptidos IL-3, puede emplearse ingeniería de proteínas. Puede usarse la tecnología de ADN recombinante conocida para aquellos expertos en la materia para crear proteínas mutantes novedosas o "muteínas", que incluyen sustituciones individuales o múltiples de aminoácidos, deleciones, adiciones, o proteínas de fusión. Tales polipéptidos modificados pueden mostrar, por ejemplo, actividad potenciada, potencia, afinidad y/o elevada estabilidad. Además, éstos pueden purificarse con rendimientos más altos y mostrar mejor solubilidad que el polipéptido natural correspondiente, por ejemplo, bajo ciertas condiciones de purificación y almacenamiento. Por ejemplo, para muchas proteínas, se conoce en la técnica que uno o más aminoácidos pueden ser deletados del extremo N o extremo C sin pérdida sustancial de función biológica. Un conjugado a modo de ejemplo comprende una IL-3 modificada con sustitución de aminoácidos K116W en la IL-3 humana. Otro conjugado a modo de ejemplo comprende los aminoácidos 125-133 ausentes de IL-3 humana. Ambos de estos conjugados con secuencias de IL-3 mutantes presentan unión potenciada al receptor de IL-3 y presentan mayor citotoxicidad contra células de leucemia (para ejemplos no limitantes de conjugados, véanse Liu et al. "Diphtheria toxin fused to variant interleukin-3 provides enhanced binding to the interleukin-3 receptor and more potent leukemia cell cytotoxicity", Exp. Hematol. 32:277-281 (2004); Hogge et al. "Variant diphtheria toxin-interleukin-3 fusion proteins with increased receptor affinity have enhanced cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitors", Clin. Cancer Res. 12:1284-1291 (2006); Testa et al. "Diphtheria toxin fused to variant human interleukin-3 induces cytotoxicity of blasts from patients with acute myeloid leukemia according to the level of interleukin-3 receptor expression", Blood 106:2527-2529 (2005); y Klein et al. "Receptor binding kinetics of human IL-3 variants with altered proliferative activity", Biochem. Biophys. Res. Comm. 288:1244-1249 (2001)).

En otra realización, un polipéptido de IL-3 es al menos el 50 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, o al menos 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de IL-3 nativa (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de IL-3 humana nativa).

### **5.1.1- MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DE INTERLEUCINA-3-TOXINA DIFTÉRICA**

Los conjugados de la presente invención pueden prepararse por técnicas de ADN recombinante convencionales o por técnicas de proteína sintética, por ejemplo, por el uso de un sintetizador de péptidos. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un conjugado de la invención puede sintetizarse por técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a nucleótidos protuberantes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia de genes quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel y col. John Wiley & Sons: 1992).

Las secuencias de nucleótidos que codifican un conjugado de la invención (secuencias de IL-3 y de toxina diftérica) pueden obtenerse de cualquier información disponible para aquellos expertos en la materia (es decir, de Genbank, la bibliografía, o por clonación rutinaria). La secuencia de nucleótidos que codifica un conjugado puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteínas insertada. En algunos casos, la secuencia de toxina diftérica puede ser truncada con el fin de eliminar un dominio específico, tal como el dominio de direccionamiento. Las técnicas para modificar o truncar el ADN son muy conocidas para aquellos expertos en la materia de la biología molecular. Por tanto, las secuencias de IL-3 y de toxina diftérica pueden ligarse de tal forma que se genere una secuencia de ADN que, cuando se traduce, crea un polipéptido que es un compuesto de la invención. En ejemplos preferidos, una secuencia conectora se introduce en la secuencia recombinante que une la secuencia de IL-3 y la secuencia de toxina diftérica. Puede utilizarse una variedad de sistemas de hospedador-vector en la presente invención para expresar la secuencia codificante de proteína. Éstos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de células de mamífero infectados con virus (por ejemplo, virus de la variolovacuna, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levadura (por ejemplo, *Pichia*) que contienen vectores de levadura; o bacterias (tales como *E. coli*) transformadas con bacteriófago, ADN, ADN de plásmido, o ADN de cósmido. Los elementos de expresión de vectores varían en sus intensidades y especificidades. Dependiendo del sistema hospedador-vector utilizado, pueden usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. En una realización específica, la proteína se expresa en *E. coli*. En otra realización específica, la proteína se expresa en *Pichia*.

La expresión de un conjugado de la invención puede controlarse por cualquier promotor o elemento potenciador conocido en la técnica. Promotores que pueden usarse para controlar la expresión de un conjugado incluyen, pero no se limitan a, la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42), el promotor de tetraciclina (Tet) (Gossen et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 89:5547-5551); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de  $\beta$ -lactamasa (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), o el promotor *tac* (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25; véase también "Useful proteins from recombinant bacteria", en Scientific American, 1980, 242:74-94); vectores de expresión en plantas que comprenden la región promotora de nopalina sintetasa (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) o promotor de 35S ARN del virus del mosaico de la coliflor (Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120); elementos promotores de levadura u otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), promotor de PGK (fosfoglicerol cinasa), promotor de fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control transcripcionales de animal, que presentan especificidad de tejido y han sido utilizadas en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); región de control del gen de la insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), región de control del gen de albúmina que es activa en hígado (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en hígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); región de control del gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocito en el cerebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); región de control del gen de la cadena ligera-2 de miosina que es activa en músculo esquelético (Sani, 1985, Nature 314:283-286); enolasa específica neuronal (NSE) que es activa en células neuronales (Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83); región de control del gen de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que es activa en células neuronales (Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophysic. Res. Com. 253:818-823); promotor de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) que es activa en astrocitos (Gomes et al., 1999, Braz. J. Med. Biol. Res. 32(5):619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83) y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378). En una realización específica, la expresión de un conjugado de la invención está regulada por un promotor constitutivo. En otra realización, la expresión está regulada por un promotor inducible. En otra realización, la expresión está regulada por un promotor específico de tejido.

En una realización específica, se usa un vector que comprende un promotor operativamente unido a un ácido nucleico que codifica conjugado, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de polipéptido o proteína de fusión puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico puede entonces insertarse en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) producirá un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Señales de iniciación específicas también pueden requerirse para la eficiente traducción de secuencias codificantes de proteína de fusión insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control traduccional exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

Pueden identificarse vectores de expresión que contienen insertos de un gen que codifica un conjugado por tres enfoques generales: (a) hibridación de ácidos nucleicos, (b) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador", y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de un gen que codifica un conjugado en un vector de expresión puede detectarse por la hibridación de ácidos nucleicos usando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen insertado que codifica el conjugado. En el segundo enfoque, el sistema de vector recombinante/hospedador puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de ciertas funciones de gen "marcador" (por ejemplo, actividad de timidina cinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de occlusión en baculovirus, etc.) producidas por la inserción de una secuencia

de nucleótidos que codifica un conjugado en el vector. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos que codifica el conjugado se inserta dentro de la secuencia del gen marcador del vector, recombinantes que contienen el gen que codifica el inserto de conjugado pueden identificarse por la ausencia de la función de gen marcador. En el tercer enfoque, pueden identificarse vectores de expresión recombinantes ensayando el producto génico (por ejemplo, conjugado) expresado por el recombinante. Tales ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales del conjugado en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, unión a un anticuerpo o el receptor de IL-3.

Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en el modo específico deseado. La expresión de ciertos promotores puede ser elevada en presencia de ciertos inductores; así, puede controlarse la expresión de proteínas de fusión genéticamente manipuladas o conjugados. Además, diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento traduccional y post-traduccional y modificación (por ejemplo, glucosilación, fosforilación de proteínas). Pueden elegirse líneas celulares apropiadas o sistemas de hospedador para garantizar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína extraña expresada. Por ejemplo, la expresión en un sistema bacteriano producirá un producto no glucosilado y la expresión en levadura producirá un producto glucosilado. Pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, NS0, y en particular, líneas celulares neuronales tales como, por ejemplo, neuroblastomas humanos SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ (Sugimoto et al., 1984, J. Natl. Cancer Inst. 73: 51-57), neuroblastoma humano SK-N-SH (Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704: 450-460), meduloblastoma cerebeloso humano DAOY (He et al., 1992, Cancer Res. 52: 1144-1148), células de glioblastoma DBTRG-05MG (Kruse et al., 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol. 28A: 609-614), neuroblastoma humano IMR-32 (Cancer Res., 1970, 30: 2110-2118), astrocitoma humano 1321N1 (Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 1977, 74: 4816), astrocitoma humano MOG-G-CCM (Br. J. Cancer 1984,49: 269), glioblastoma-astrocitoma humano U87MG (Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1968, 74: 465-486), glioblastoma humano A172 (Olopade et al., 1992, Cancer Res. 52: 2523-2529), células de glioma de rata C6 (Benda et al., 1968, Science 161: 370-371), neuroblastoma de ratón Neuro-2a (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1970, 65: 129-136), neuroblastoma de ratón NB41A3 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1962, 48: 1184-1190), plexo coroideo de oveja SCP (Bolin et al., 1994, J. Virol. Methods 48: 211-221), G355-5, astrocito normal PG-4 Cat (Haapala et al., 1985, J. Virol. 53: 827-833), cerebro de hurón Mpf (Trowbridge et al., 1982, In Vitro 18: 952-960) y líneas celulares normales tales como, por ejemplo, cerebro de corteza normal de rata CTX TNA2 (Radany et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 6467-6471) tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst. Además, diferentes sistemas de expresión de vector/hospedador pueden efectuar reacciones de procesamiento a diferentes grados.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de conjugados recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan establemente el conjugado de la invención. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN foráneo, puede permitirse que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y entonces se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan un conjugado de la invención.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, la timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223), genes de hipoxantinaganina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48:2026) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, et al., 1980, Cell 22:817) pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Por tanto, puede usarse resistencia anti-metabolito como la base de selección para dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, et al., 1984, Gene 30:147).

Una vez un conjugado de la invención ha sido producido por expresión recombinante o por síntesis química, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de proteína A, y cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

## 5.2 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un conjugado de toxina diftérica-interleucina-3 de la invención. En particular, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un conjugado de la invención y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, una composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un conjugado de la invención y un

excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración veterinaria y/o humana. Las composiciones farmacéuticas también son adecuadas para purga *ex vivo* de una médula ósea o muestra de sangre periférica, por ejemplo, como puede ponerse en práctica antes de la reintroducción de la muestra purgada como una trasplante autólogo de nuevo al paciente como puede ponerse en práctica tras quimioterapia de alta dosis para el cáncer.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un sujeto, siendo dicho sujeto preferentemente un animal, que incluye, pero no se limita a, un ser humano, mamífero, o animal no humano, tal como una vaca, caballo, oveja, cerdo, ave de corral, gato, perro, ratón, rata, conejo, cobaya, etc., y es más preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano.

Las composiciones de la invención pueden estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Vías de administración típicas pueden incluir, sin limitación, oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, intradérmica, intratumoral, intracerebral, intratecal e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, técnicas de inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intraesternal. En una realización específica, las composiciones se administran por vía parenteral. En una realización más específica, las composiciones se administran por vía intravenosa. Composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para permitir que un compuesto de la invención esté biodisponible tras la administración de la composición a un sujeto. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación única, y un recipiente de un compuesto de la invención en forma de aerosol pueden contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Materiales usados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para aquellos expertos habituales en la materia que la dosificación óptima del (de los) principio(s) activo(s) en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de sujeto (por ejemplo, ser humano), la salud general del sujeto, el tipo de cáncer para el que el sujeto está en necesidad de tratamiento, el uso de la composición como parte de un régimen multi-fármaco, la forma particular del compuesto de la invención, el modo de administración y la composición empleada.

El excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable puede estar en partículas, de manera que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimidos o de polvo. El (Los) vehículo(s) puede(n) ser líquido(s), siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o líquido inyectable. Además, el (los) vehículo(s) puede(n) ser gaseoso(s), de manera que se proporcione una composición en aerosol útil en, por ejemplo, administración inhaladora.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que un compuesto de la invención se administra. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administran a un sujeto, los compuestos de la invención y vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo preferido cuando el compuesto de la invención se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y dextrosa acuosa y disoluciones de glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH.

La composición puede estar prevista para administración por vía oral, y si es así, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, donde formas semi-sólidas, semi-líquidas, en suspensión y gel están incluidas dentro de las formas consideradas en el presente documento como o bien sólidas o bien líquidas.

Como una composición sólida para administración por vía oral, la composición puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido por compresión, píldora, cápsula, chicle, oblea, o forma similar. Una composición sólida tal normalmente contiene uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como etilcelulosa, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un aromatizante tal como aromatizante de menta, salicilato de metilo o naranja, y un agente colorante.

Cuando la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina, o un aceite graso.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, disolución, emulsión, o suspensión. El líquido puede ser útil para administración por vía oral o para administración mediante inyección. Cuando está previsto para administración por vía oral, una composición puede comprender uno o más de un edulcorante, conservante, colorante/colorante, y potenciador del aroma. En una composición para administración mediante inyección, también puede incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

Las composiciones líquidas de la invención, si son disoluciones, suspensiones, u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, disolución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir de disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol, u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. Una composición parenteral puede estar encerrada en una ampolla, una jeringa desechable, o un vial de múltiples dosis hecho de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición inyectable es preferentemente estéril.

Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de la invención de forma que se obtendrá una dosificación adecuada (véase la Sección 5.3.1, abajo, para dosificaciones adecuadas). Normalmente, esta cantidad es al menos el 0,01 % de un conjugado de la invención en peso de la composición. Cuando está prevista para administración por vía oral, esta cantidad puede variarse para estar entre el 0,1 % y el 80 % en peso de la composición. Composiciones orales preferidas pueden comprender entre el 4 % y el 50 % del compuesto de la invención en peso de la composición. Composiciones preferidas de la presente invención se preparan de manera que una unidad de dosificación parenteral contenga entre el 0,01 % y el 2 % en peso del compuesto de la invención.

Las composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de administración, por ejemplo, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y pueden ser útiles para administrar un compuesto de la invención. En ciertas realizaciones, más de un compuesto de la invención se administra a un sujeto. Métodos de administración pueden incluir, pero no se limitan a, administración por vía oral y administración parenteral; incluyendo la administración parenteral, pero no se limita a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea; intranasal, epidural, sublingual, intranasal, intracerebral, intraventricular, intratecal, intravaginal, transdérmica, por vía rectal, por inhalación, o por vía tópica a los oídos, nariz, ojos o piel. El modo de administración preferido se deja a criterio del médico, y dependerá, en parte, del sitio de la afección médica (tal como el sitio de cáncer, un tumor canceroso o una afección pre-cancerosa).

En una realización, los compuestos de la invención se administran por vía parenteral. En una realización específica, los compuestos de la invención se administran por vía intravenosa. En otra realización, los compuestos de la invención se administran por infusión continua. En una realización particular, los compuestos de la invención se administran por una infusión que dura durante aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 2 horas.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía; administración tópica, por ejemplo, conjuntamente con un apósito para heridas después de cirugía; mediante inyección; por medio de un catéter; por medio de un supositorio; o por medio de un implante, siendo el implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor, o tejido precanceroso. En ciertas realizaciones, puede desearse introducir uno o más compuestos de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. En ciertas realizaciones, uno o más compuestos de la invención pueden inyectarse por vía intraperitoneal.

También puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, usando un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarburo o sintético. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos.

En otra realización más, los compuestos de la invención pueden administrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véanse Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald et al., Surgery 1980, 88: 507; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 1989, 321: 574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, FL, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 1983, 23,

61; véase también Levy et al., Science 1985, 228, 190; During et al., Ann. Neurol. 1989, 25, 351; Howard et al., J. Neurosurg., 1989, 71, 105). En otra realización más, puede disponerse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana de los compuestos de la invención, por ejemplo, el cerebro, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, arriba, vol. 2, 1984, pp. 115-138). También pueden usarse otros sistemas de liberación controlada tratados en la revisión por Langer (Science 1990, 249, 1527-1533).

En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de los compuestos de la invención (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.679.377; la patente de EE.UU. N.º 5.916.597; la patente de EE.UU. N.º 5.912.015; la patente de EE.UU. N.º 5.989.463; la patente de EE.UU. N.º 5.128.326; publicación PCT N.º WO 99/15154; y publicación PCT N.º WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable.

En una realización específica, puede usarse una bomba para administrar los compuestos de la invención (véanse, por ejemplo, Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald et al., Surgery 1980, 88: 507; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 1989, 321: 574). En una realización específica, la bomba puede ser, pero no se limita a, una bomba de tipo insulina.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, pellas, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, esprays, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una cápsula (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.698.155). Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin.

Composiciones de liberación sostenida o dirigida que pueden formularse incluyen, pero no se limitan a, compuestos de la invención protegidos con recubrimientos diferencialmente degradables, por ejemplo, por microencapsulación, múltiples recubrimientos, etc. También es posible liofilizar las composiciones y usar los liofilizados obtenidos, por ejemplo, para la preparación de productos para inyección.

En una realización preferida, los conjugados de la invención se formulan según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a animales, particularmente seres humanos. Normalmente, los excipientes o vehículos para administración intravenosa son disoluciones de tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Composiciones para administración intravenosa pueden opcionalmente comprender un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Donde un conjugado de la invención va a administrarse por infusión, puede ser dispensado, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Donde el conjugado de la invención se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los componentes puedan mezclarse antes de la administración.

Composiciones para administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o aceitosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes, o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales, por ejemplo, edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente sabrosa. Además, donde está en forma de comprimido o píldora, las composiciones pueden recubrirse para retardar la disgregación y absorción en el tubo gastrointestinal, proporcionándose así una acción sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. Membranas selectivamente permeables que rodean un complejo de acción osmóticamente activa también son adecuadas para composiciones administradas por vía oral de la invención. En estas plataformas posteriores, el fluido del entorno que rodea la cápsula es absorbido por el complejo de acción, que se hincha para desplazar el agente o la composición de agente a través de una abertura. Estas plataformas de administración pueden proporcionar un perfil de administración de orden esencialmente cero a diferencia de los perfiles en forma de pico de formulaciones de liberación inmediata. También puede usarse un material de retraso de tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol. Composiciones orales puede incluir excipientes estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Tales vehículos son preferentemente de calidad farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser previstas para administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede estar en forma de una disolución, emulsión, pomada, o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: petrolato, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizadores. Los espesantes pueden estar presentes en una composición para administración tópica. Si está prevista para administración transdérmica, la composición puede estar en forma de un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un compuesto de la invención de entre el 0,01 % y el 10 % en peso/volumen (peso por unidad volumen de composición).

Las composiciones pueden incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una vaina de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la vaina de recubrimiento normalmente son inertes, y pueden seleccionarse de, por ejemplo, azúcar, Shellac, y otros agentes de recubrimiento entérico. Alternativamente, los principios activos pueden estar encerrados en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden consistir en unidades de dosificación gaseosas, por ejemplo, pueden estar en forma de un aerosol. El término aerosol se usa para indicar una variedad de sistemas que varían de aquellos de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases presurizados. La administración puede ser por un gas licuado o comprimido o por un sistema de bomba adecuado que dispensa los principios activos. Los aerosoles de las composiciones pueden administrarse en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos con el fin de administrar la composición. La administración del aerosol incluye los recipientes necesarios, activadores, válvulas, sub-receptores, espaciadores y similares, que juntos pueden formar un kit. Aerosoles preferidos pueden ser determinados por un experto en la materia, sin excesiva experimentación.

Si están en forma sólida, líquida o gaseosa, las composiciones de la presente invención pueden comprender un agente activo adicional seleccionado de entre aquellos que incluyen, pero no se limitan a, un agente profiláctico adicional, un agente terapéutico adicional, un agente antiemético, un factor estimulante de colonias hematopoyético, una terapia adyuvante, una vacuna u otro agente inmunoestimulante, un agente basado en anticuerpo/fragmento de anticuerpo, un antidepresivo y un agente analgésico. Por ejemplo, en una realización particular, la composición farmacéutica comprende un compuesto de la invención, un agente adicional y un excipiente o vehículo aceptable farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse usando metodología muy conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición prevista para ser administrada mediante inyección puede prepararse combinando un compuesto de la invención con agua para formar una disolución. Un tensioactivo puede añadirse para facilitar la formación de una disolución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son complejos que pueden interactuar no covalentemente con un compuesto de la invención para facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto de la invención en el sistema de administración acuosa.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o más agentes terapéuticamente activos conocidos.

### **5.3 USOS TERAPÉUTICOS Y PROFILÁCTICOS DE CONJUGADOS DE FUSIÓN DE INTERLEUCINA-3-TOXINA DIFTÉRICA**

La presente divulgación proporciona métodos de inhibición del receptor de IL-3 que expresan células en un ser humano en necesidad del mismo administrando una cantidad eficaz de un conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica de la invención. En ciertas realizaciones, el receptor de IL-3 que expresa las células no son células de leucemia mieloide. En algunas realizaciones, las células expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3. En otras realizaciones, las células expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3. En aún otras realizaciones, las células expresan tanto las subunidades alfa como beta del receptor de IL-3.

La presente invención se refiere a terapias que implican administrar uno o más de los conjugados de interleucina-3-toxina diftérica de la invención y composiciones que comprenden los conjugados de interleucina-3-toxina diftérica a un sujeto, preferentemente un sujeto humano, para prevenir, tratar, gestionar y/o mejorar la enfermedad o trastorno que muestra o se caracteriza por la expresión del receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de la misma. En una realización, la invención proporciona un método de prevención, tratamiento, gestión y/o mejora de una enfermedad o trastorno que muestra o se caracteriza por la expresión del receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de la misma, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad eficaz de uno o más los conjugados de interleucina-3-toxina diftérica de la invención. Tales enfermedades y trastornos incluyen cáncer, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.

La invención también proporciona métodos que comprenden administrar a un sujeto en necesidad del mismo un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica de la invención y una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintas del conjugado de interleucina-3-toxina diftérica de la invención que están actualmente siendo usadas, se han usado, son conocidas por ser útiles, o pueden ser útiles en la prevención, tratamiento, gestión y/o mejora de una enfermedad o trastorno que muestra o se caracteriza por la expresión del

receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de la misma. Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación de la invención pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente. En una realización específica, las terapias de combinación de la invención comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de la invención y una cantidad eficaz de al menos otra terapia que tiene el mismo mecanismo de acción que dicho conjugado. En una realización específica, las terapias de combinación de la invención comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de la invención y una cantidad eficaz de al menos otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente que dicho conjugado. En ciertas realizaciones, las terapias de combinación de la presente invención mejoran el efecto profiláctico o terapéutico de un conjugado de la invención funcionando junto con el conjugado para tener un efecto aditivo o sinérgico. En ciertas realizaciones, las terapias de combinación de la presente invención reducen los efectos secundarios asociados a los agentes profilácticos o terapéuticos. En otras realizaciones, las terapias de combinación se administran antes, durante o después de la administración de las composiciones de la invención.

El cáncer o la enfermedad neoplásica enfermedad neoplásica, que incluye, pero no se limita a, neoplasias, tumores, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por crecimiento celular no controlado, puede tratarse, suprimirse, retrasarse, gestionarse, inhibirse o prevenirse administrando a un sujeto en necesidad del mismo un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un compuesto de la invención. En realizaciones específicas, la invención engloba el tratamiento, supresión, retraso, gestión, inhibición del crecimiento y/o progresión, y prevención del cáncer o enfermedad neoplásica como se describe en el presente documento.

En una realización, los conjugados de la invención se administran como monoterapia para la prevención, tratamiento y/o gestión del cáncer.

En un aspecto de la invención, el método se refiere a tratar cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en el que el paciente ha sido diagnosticado con cáncer.

En un aspecto de la invención, el método se refiere a tratar cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en el que el paciente ha recaído del cáncer.

En un aspecto de la invención, el método se refiere a tratar cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en el que el paciente ha fracasado con esta fracasando con la terapia.

En un aspecto de la invención, el método se refiere a tratar cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en el que el paciente está en remisión del cáncer.

En un aspecto de la invención, el método se refiere a tratar cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en el que el paciente es resistente a terapia.

En una realización, el cáncer es un cáncer hematológico. Por ejemplo, el cáncer puede ser leucemia, linfoma, síndrome mielodisplásico (SMD) o mieloma. En otra realización, el cáncer es un tumor sólido.

En una realización de este aspecto, el paciente ha recibido o está recibiendo otra terapia. En otra realización de este aspecto, el paciente no ha recibido previamente una terapia para la prevención, tratamiento y/o gestión del cáncer.

El profesional médico puede diagnosticar al paciente usando cualquiera de los métodos de cribado del cáncer convencionales, que incluyen, pero no se limitan a, examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen rectal, examen de mama, examen de ganglios linfáticos, examen abdominal, supervisión de la piel, examen testicular, palpación general), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), análisis citológicos vaginales (cáncer de cuello uterino), análisis de guayacol en heces, análisis de sangre (por ejemplo, prueba de hemograma completo (CBC), prueba del antígeno específico de la próstata (PSA), prueba del antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba del antígeno del cáncer (CA)-125, alfa-fetoproteína (AFP), pruebas de la función hepática), análisis de cariotipificación, análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de tumores malignos hematológicos), histología, citología, citometría de flujo, un análisis de esputo, y métodos de obtención de imágenes (por ejemplo, tomografía computerizada (CT), imagen por resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, obtención de imágenes de rayos X, mamografía, barridos de PET, gammagrafías óseas, barridos de radionúclidos).



En otro aspecto de la invención, el método se refiere a tratar un tumor sólido en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente en necesidad del mismo un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado o composición farmacéutica de la invención en el que el paciente ha sido diagnosticado con un tumor sólido, y en el que el paciente ha experimentado una terapia primaria para reducir la masa del tumor. La terapia primaria para reducir el tamaño de la masa tumoral es preferentemente una terapia distinta de un conjugado de la invención. En una realización específica de este aspecto, el tumor sólido es fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de huesos, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer de boca, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma o retinoblastoma.

En otro aspecto de la invención, el método se refiere a tratar cáncer, comprendiendo el método administrar a un paciente en necesidad del mismo un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención, en el que el paciente recibió otra terapia. En algunas realizaciones, la terapia previa es, por ejemplo, quimioterapia, terapia de moléculas pequeñas, radioinmunoterapia, terapia con toxinas, terapia con enzimas activantes de profármacos, terapia biológica, terapia con anticuerpos, terapia quirúrgica, terapia con hormonas, inmunoterapia, terapia antiangiogénica, terapia dirigida, terapia epigenética, terapia de desmetilación, terapia con inhibidores de histona desacetilasa, terapia de diferenciación, radioterapia, o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la terapia previa ha fracasado en el paciente. En algunas realizaciones, el régimen terapéuticamente eficaz que comprende la administración de un conjugado de la invención se administra al paciente inmediatamente después de que el paciente haya recibido la terapia previa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el resultado de la terapia previa puede ser desconocido antes de que el paciente se administre con el conjugado.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de prevención de cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente en necesidad del mismo un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención, en el que el cáncer en el paciente ha entrado en remisión. En algunas realizaciones de este aspecto, mediante la administración de un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el profesional médico puede curar eficazmente el cáncer, o prevenir su remanifestación.

En otro aspecto de la invención, el método se refiere a tratar cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente en necesidad del mismo un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un compuesto o composición de la invención, en el que el conjugado se administra a una dosis que es inferior a la máxima dosis tolerada (MTD) durante un periodo de tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de prevención, tratamiento y/o gestión de cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente en necesidad del mismo un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente un conjugado de la invención, en el que el conjugado se administra a una dosis que es inferior a la dosis equivalente en humanos (HED) del nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) durante un periodo de tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más. El NOAEL, como se determina en estudios en animales, es útil en la determinación de la dosis inicial recomendada máxima para ensayos clínicos en humanos. Por ejemplo, los NOAEL pueden extrapolarse para determinar dosis equivalentes en humanos. Normalmente, tales extrapolaciones entre especies se realizan basándose en las dosis que se normalizaron al área superficial del cuerpo (es decir,  $\text{mg}/\text{m}^2$ ). En realizaciones específicas, los NOAEL se determinan en ratones, hámsteres, ratas, hurones, cobayas, conejos, perros, primates (monos, titis, monos ardilla, babuinos), microcerdos, o minicerdos. Para una discusión sobre el uso de NOAEL y su extrapolación para determinar dosis equivalentes en humanos, véase Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology, julio de 2005.

Aunque no se está ligado a teoría específica alguna, los solicitantes creen que por la administración de los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces, la población de células madre de cáncer de un cáncer/tumor se estabiliza o reduce, para limitar o prevenir la posible repoblación del tumor.

5 En ciertas realizaciones de estos aspectos, los regímenes comprenden administrar un régimen profilácticamente eficaz y/o un régimen terapéuticamente eficaz, en el que el régimen produce una reducción en la población de células madre de cáncer en el paciente. En una realización, el paciente que recibe el régimen se monitoriza para determinar si el régimen ha producido una reducción en la población de células madre de cáncer en el paciente.

10 Normalmente, la monitorización de la cantidad de células madre cancerosas se realiza detectando la cantidad de células madre cancerosas en un espécimen extraído del paciente. Métodos de detección de la cantidad de células madre cancerosas en un espécimen se describen abajo en la Sección 5.4. Esta etapa de monitorización normalmente se realiza al menos 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, o 30, 60, 90, 120 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, o >12 meses después de que el paciente empiece a recibir el régimen.

15 En algunas realizaciones, el espécimen puede ser un espécimen de sangre, en el que se cuantifica la cantidad de células madre cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo de unidad en el caso de un análisis histológico). En ciertas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre, como un subconjunto de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre, o como un subconjunto de un subconjunto de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre. La cantidad de células madre de cáncer, en otras realizaciones, puede determinarse como un porcentaje de los glóbulos  
20 sanguíneos totales.

En otras realizaciones, el espécimen extraído del paciente es un espécimen de tejido (por ejemplo, una biopsia extraída de supuesto tejido canceroso), donde la cantidad de células madre cancerosas puede medirse, por ejemplo, basándose en la cantidad de células madre cancerosas por unidad de peso del tejido. En ciertas realizaciones, la  
25 cantidad de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en el tejido, como un subconjunto de las células cancerosas presentes en el tejido, o como un subconjunto de un subconjunto de las células cancerosas presentes en el tejido.

La cantidad de células madre cancerosas en el espécimen extraído puede compararse con la cantidad de células madre cancerosas medidas en muestras de referencia para evaluar la eficacia del régimen, y la mejora del cáncer en  
30 terapia. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que recibe la terapia, en la que el espécimen se extrae del paciente en un momento de tiempo temprano (por ejemplo, antes de recibir el régimen, como una muestra de referencia del nivel inicial, o en un momento de tiempo anterior mientras que recibe la terapia). En otra realización, la muestra de referencia se extrae de un paciente sanos no afectado por el cáncer.

En otras realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen extraído puede compararse con un intervalo de referencia predeterminado. En una realización específica, el intervalo de referencia predeterminado se  
35 basa en i) la cantidad de células madre cancerosas obtenidas de una población (poblaciones) de pacientes que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente que recibe la terapia, o ii) la cantidad de células madre obtenidas de una población (poblaciones) de pacientes sin cáncer.

Si se determina que la reducción en la cantidad de células madre cancerosas es demasiado pequeña tras comparar con la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen extraído del paciente que recibe el régimen con el  
40 espécimen de referencia, entonces el profesional médico tiene varias opciones para ajustar el régimen. Por ejemplo, el profesional médico pueden entonces aumentar o bien la dosificación del compuesto o composición de la invención administrada, la frecuencia de la administración, la duración de la administración, o bien cualquier combinación de los mismos. En una realización específica, después de hacerse la determinación, puede administrarse una segunda cantidad eficaz de un compuesto o composición de la invención al paciente.

45 En ciertas realizaciones, si se determina que la reducción en la cantidad de células madre cancerosas es aceptable tras comparar con la cantidad de células madre cancerosas en la muestra obtenida del paciente que recibe el régimen terapéutico o profiláctico con la muestra de referencia, entonces el profesional médico puede elegir no ajustar el régimen. Por ejemplo, el profesional médico puede elegir no aumentar o bien la dosificación del compuesto o composición de la invención que se administra, la frecuencia de la administración, la duración de la administración,  
50 o bien cualquier combinación de los mismos. Además, el profesional médico puede elegir añadir terapias adicionales o combinar terapias.

En otras realizaciones, los regímenes comprenden administrar un régimen profilácticamente eficaz y/o un régimen terapéuticamente eficaz, en el que el régimen produce una reducción en la cantidad de células cancerosas en el  
55 paciente. En una realización, el paciente que recibe el régimen se monitoriza para determinar si el régimen ha producido una reducción en la cantidad de células cancerosas en el paciente.

Normalmente, la monitorización de la cantidad de células cancerosas se realiza detectando la cantidad de células cancerosas en un espécimen extraído del paciente. Métodos de detección de la cantidad de células cancerosas en un espécimen se describen abajo en la Sección 5.5. Esta etapa de monitorización normalmente se realiza al menos

1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, o 30, 60, 90, 120 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, o >12 meses después de que el paciente empiece a recibir el régimen.

5 En algunas realizaciones, el espécimen puede ser un espécimen de sangre, en el que se cuantifica la cantidad de células cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo de unidad en el caso de un análisis histológico). La población de células cancerosas, en ciertas realizaciones, puede determinarse como un porcentaje de los glóbulos sanguíneos totales.

10 En algunas realizaciones, la muestra obtenida del paciente puede ser un espécimen de médula ósea, en el que se cuantifica la cantidad de células cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo de unidad en el caso de un análisis histológico). La población de células cancerosas, en ciertas realizaciones, puede determinarse como un porcentaje de las células de médula ósea totales.

En otras realizaciones, el espécimen extraído del paciente es un espécimen de tejido (por ejemplo, una biopsia extraída de presunto tejido canceroso), donde la cantidad de células cancerosas puede medirse, por ejemplo, basándose en la cantidad de células cancerosas por unidad de peso del tejido. La cantidad de células cancerosas también puede medirse usando inmunohistoquímica o citometría de flujo.

15 La cantidad de células cancerosas en el espécimen extraído puede compararse con la cantidad de células cancerosas medida en muestras de referencia para evaluar la eficacia del régimen y mejora del cáncer en terapia. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que recibe terapia, en el que el espécimen del paciente se extrae en un momento de tiempo anterior (por ejemplo, antes de recibir el régimen, como una muestra de referencia del nivel inicial, o en un momento de tiempo anterior mientras que recibe la terapia). En otra realización, la muestra de referencia se extrae de un paciente sano no afectado por el cáncer.

20 En otras realizaciones, la población de células cancerosas en el espécimen extraído puede compararse con un intervalo de referencia predeterminado. En una realización específica, el intervalo de referencia predeterminado se basa en la cantidad de células cancerosas obtenidas de una población (poblaciones) de pacientes que padece(n) el mismo tipo de cáncer que el paciente que recibe la terapia.

25 Si se calcula que la reducción en la población de células cancerosas es demasiado pequeña tras comparar la cantidad de células cancerosas en el espécimen extraído de los pacientes que reciben la terapia con el espécimen de referencia, entonces el profesional médico tiene varias opciones para ajustar el régimen terapéutico. Por ejemplo, el profesional médico puede entonces o bien aumentar la dosificación del compuesto o composición de la invención administrada, la frecuencia de la administración, la duración de la administración, o bien cualquier combinación de los mismos. En una realización específica, después de hacerse la determinación, puede administrarse una segunda cantidad eficaz de un compuesto o composición de la invención al paciente.

30 Si se juzga que la reducción en la población de células cancerosas es adecuada tras comparar la cantidad de células cancerosas en el espécimen extraído de los pacientes que reciben terapia con el espécimen de referencia, entonces el profesional médico puede elegir no ajustar el régimen terapéutico. Por ejemplo, el profesional médico puede elegir no aumentar la dosificación del compuesto o composición de la invención administrado, la frecuencia de la administración, la duración de la administración, o cualquier combinación de los mismos.

Los métodos de monitorización anteriores también pueden usarse para monitorizar la cantidad de células que expresan el receptor de interleucina-3 donde la enfermedad o trastorno no es un cáncer, es decir, en enfermedad alérgica o enfermedad autoinmunitaria.

40 En realizaciones, el profesional médico puede elegir medir la población de cáncer usando técnicas de obtención de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, un ligando para un marcador de tumor puede conjugarse con un radioisótopo, compuesto emisor de fotones, u otro compuesto emisor de señales, y entonces el ligando puede inyectarse en el paciente. Las células cancerosas pueden entonces cuantificarse midiendo la señal generada cuando el ligando se une a las células cancerosas *in vivo*.

#### 45 **5.3.1 DOSIFICACIÓN Y FRECUENCIA DE ADMINISTRACIÓN**

La cantidad de una composición farmacéutica de toxina diftérica-interleucina-3 de la invención usada en los regímenes profilácticos y/o terapéuticos que será eficaz en la prevención, tratamiento y/o gestión de enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, que incluye cáncer, puede determinarse por los métodos desvelados en el presente documento. La frecuencia y dosificación variarán según factores específicos para cada paciente dependiendo de los conjugados específicos administrados, la gravedad de la afección (por ejemplo, cancerosa), la vía de administración, además de la edad, cuerpo, peso, respuesta, y los antecedentes personales del paciente. Por ejemplo, la dosificación de un conjugado de la invención que será eficaz en el tratamiento, prevención y/o gestión del cáncer puede determinarse administrando el compuesto en un modelo animal tal como, por ejemplo, los modelos animales desvelados en el presente documento o conocidos para aquellos expertos en la materia. Véase la Sección 5.7.2, abajo. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. Véase la Sección 5.7.1, abajo.

En algunas realizaciones, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos comprenden ajustar las dosificaciones administradas al paciente para lograr una medida especificada de eficacia terapéutica. Tales medidas incluyen una reducción en la cantidad de células madre cancerosas en o del paciente y/o una reducción en la cantidad de células cancerosas en o del paciente.

- 5 En algunas realizaciones, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos comprenden administrar dosificaciones y regímenes de un conjugado o composición farmacéutica de la invención que son eficaces para reducir las células madre de cáncer. Métodos que pueden usarse para determinar la cantidad de células madre cancerosas en un paciente antes de, durante y/o tras la terapia se tratan abajo en la Sección 5.4.

10 En ciertas realizaciones, la dosificación del conjugado de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutica se ajusta para lograr una reducción en la cantidad de células madre cancerosas encontrada en un espécimen de prueba extraído de un paciente después de recibir el régimen terapéutico, en comparación con una muestra de referencia. Aquí, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que recibe terapia, en el que el espécimen se extrae del paciente en un momento de tiempo anterior. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del mismo paciente, antes de recibir el régimen profiláctico o terapéutico. En realizaciones específicas, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen de prueba es al menos del 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % más baja que en la muestra de referencia.

15 En otras realizaciones, la dosificación del conjugado de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutico se ajusta para lograr una reducción en la cantidad de células madre cancerosas encontrada en un espécimen de prueba extraído de un paciente después de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico, en comparación con una muestra de referencia, en las que el espécimen de muestra de referencia se extrae de un paciente sano no afectado por el cáncer. En realizaciones específicas, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen de prueba está al menos dentro del 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o 2 % de la cantidad de células madre cancerosas en la muestra de referencia.

20 En algunas realizaciones, la dosificación del conjugado de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutico se ajusta para lograr una cantidad de las células madre cancerosas que entra dentro de un intervalo de referencia predeterminado. En estas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en un espécimen de prueba se compara con un intervalo de referencia predeterminado. En una realización específica, el intervalo de referencia predeterminado se basa en la cantidad de células madre cancerosas obtenidas de una población (poblaciones) de pacientes que padece(n) el mismo tipo de cáncer que el paciente que recibe la terapia.

25 En algunas realizaciones, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos comprenden administrar dosificaciones de un conjugado o composición farmacéutica de la invención que son eficaces para reducir la población de células cancerosas. Métodos que pueden usarse para determinar la población de células cancerosas en un paciente que recibe tratamiento se tratan abajo en la Sección 5.5.

30 En ciertas realizaciones, la dosificación del conjugado de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutico se ajusta para lograr una reducción en la cantidad de células cancerosas encontrada en un espécimen de prueba extraído de un paciente después de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico, en comparación con una muestra de referencia. Aquí, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que recibe terapia, en el que el espécimen se extrae del paciente en un momento de tiempo anterior. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del mismo paciente, antes de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico. En realizaciones específicas, la cantidad de células cancerosas en el espécimen de prueba es al menos del 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o 60 % más baja que en la muestra de referencia.

35 En algunas realizaciones, la dosificación del conjugado de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutico se ajusta para lograr una cantidad de células cancerosas que entra dentro de un intervalo de referencia predeterminado. En estas realizaciones, la cantidad de células cancerosas en un espécimen de prueba se compara con un intervalo de referencia predeterminado.

40 En otras realizaciones, la dosificación del conjugado de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutico se ajusta para lograr una reducción en la cantidad de células cancerosas encontrada en un espécimen de prueba extraído de un paciente después de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico, en comparación con una muestra de referencia, en el que la muestra de referencia es un espécimen extraído de un paciente sano no afectado por el cáncer. En realizaciones específicas, la cantidad de células cancerosas en el espécimen de prueba está al menos dentro del 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, o 2 % de la cantidad de células cancerosas en la muestra de referencia.

45 En el tratamiento de ciertos pacientes humanos que tienen tumores sólidos, el extraer múltiples especímenes de tejido de un supuesto sitio tumoral puede o puede no demostrar ser imposible. En estas realizaciones, la dosificación de los compuestos de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutico para un paciente humano se extrapola de la dosis en modelos animales que son eficaces para reducir la cantidad de células madre cancerosas en aquellos modelos animales. En los modelos animales, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos se ajustan para lograr una reducción en la cantidad de células madre cancerosas encontrada en un espécimen de prueba extraído de un animal

después de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico, en comparación con una muestra de referencia. La muestra de referencia puede ser un espécimen extraído del mismo animal, antes de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico. En realizaciones específicas, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen de prueba es al menos del 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o 60 % más baja que en la muestra de referencia. Las dosis eficaces en reducir la cantidad de células madre cancerosas en los animales pueden normalizarse al área superficial del cuerpo ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) para proporcionar una dosis equivalente en humanos.

Los regímenes profilácticos y/o terapéuticos desvelados en el presente documento comprenden la administración de un conjugado de la invención o composiciones farmacéuticas del mismo al paciente en una dosis única o en múltiples dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, o más dosis).

En una realización, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos comprenden la administración de un conjugado de la invención o composiciones farmacéuticas del mismo en múltiples dosis. Cuando se administran en múltiples dosis, el conjugado o composiciones farmacéuticas se administran con una frecuencia y en una cantidad suficiente para prevenir, tratar y/o gestionar la afección. En una realización, la frecuencia de administración oscila de una vez al día hasta aproximadamente una vez cada ocho semanas. En otra realización, la frecuencia de administración oscila de aproximadamente una vez a la semana hasta aproximadamente una vez cada seis semanas. En otra realización, la frecuencia de administración oscila de aproximadamente una vez cada tres semanas hasta aproximadamente una vez cada cuatro semanas. En ciertas realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de una semana a dos años. En otra realización más, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas o mayor. En otras realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a un año. En realizaciones adicionales, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a seis meses. En algunas realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a doce semanas. En aún otras realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a seis semanas. En ciertas realizaciones, el conjugado se administra una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, o siete veces a la semana. En realizaciones preferidas, el conjugado se administra al menos tres veces a la semana. En otras realizaciones preferidas, el compuesto se administra diariamente durante cinco días consecutivos, o diariamente durante siete días consecutivos. En otras realizaciones, el conjugado se administra una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, o cinco veces al día. En realizaciones preferidas, el conjugado se administra tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas. En algunas realizaciones, cada vez que el conjugado se administra, se administra a una dosis de  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día o mayor. En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince ciclos.

En aspectos específicos de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día a aproximadamente  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día a aproximadamente  $9 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día a aproximadamente  $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente  $5,3 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día, o a una dosis de aproximadamente  $7,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día, o a una dosis de aproximadamente  $9,4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día, o a una dosis de aproximadamente  $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. En realizaciones específicas, donde la enfermedad o trastorno es leucemia mieloide, la dosificación dada está en un intervalo de entre superior a  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día a aproximadamente  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. Las dosificaciones por día descritas en el presente documento pueden administrarse en días consecutivos y/o no consecutivos. En una realización específica, se administra una dosificación por día en días no consecutivos durante una semana, por ejemplo, lunes, miércoles y viernes. En otra realización específica, se administra una dosificación por día en días consecutivos durante una semana, por ejemplo, lunes, martes, miércoles, jueves y viernes.

En aspectos específicos de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día a aproximadamente  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día a aproximadamente  $9 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En aún otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de aproximadamente  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día a aproximadamente  $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado puede administrarse a una dosis de aproximadamente  $5,3 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día, o a una dosis de aproximadamente  $7,1 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día, o a una dosis de aproximadamente  $9,4 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día, o a una dosis de aproximadamente  $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$  por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. En realizaciones específicas, donde la enfermedad o trastorno es leucemia mieloide, la dosificación dada está en un intervalo de entre superior a  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  y aproximadamente  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

En otra realización, donde la enfermedad es síndrome mielodisplásico, la dosificación dada es al menos  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  o mayor.

En algunas realizaciones de la invención, la dosificación de un conjugado de la invención o composición farmacéutica del mismo administrada es al menos 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80,

90 o 100 veces más baja que la máxima dosis tolerada (MTD) durante un periodo de una semana, dos semanas, un mes, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más.

5 En algunas realizaciones de la invención, la dosificación de un conjugado de la invención o composición farmacéutica del mismo administrada es al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,8, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 veces más baja que la dosis equivalente en humanos (HED) del nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) durante un periodo de una semana, dos semanas, un mes, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más. Véase la discusión en la Sección 5.3, arriba.

10 En ciertas realizaciones, la dosificación de un conjugado de la invención se administra como una infusión intravenosa durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 120, 180, o 240 minutos.

15 Generalmente, la dosificación de un conjugado de la invención administrada a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar el cáncer está en el intervalo de 0,01 a 500 µg/kg, y más normalmente, en el intervalo de 0,1 µg/kg a 100 µg/kg, del peso corporal del sujeto. En una realización, la dosificación administrada a un sujeto está en el intervalo de 0,1 µg/kg a 50 µg/kg, o 1 µg/kg a 50 µg/kg, del peso corporal del sujeto, más preferentemente en el intervalo de 0,1 µg/kg a 25 µg/kg, 1 µg/kg a 25 µg/kg, o 4 a 12,5 µg/kg, del peso corporal del paciente. En una realización preferida, la dosificación de conjugado de la invención administrada a un sujeto es 4 µg/kg, 5,32 µg/kg, 7,07 µg/kg, 9,4 µg/kg, o 12,5 µg/kg, del peso corporal del paciente.

20 En una realización específica, la dosificación de un conjugado de la invención administrada a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar el cáncer en un paciente es 500 µg/kg o menos, preferentemente 250 µg/kg o menos, 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 12,5 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 9,4 µg/kg o menos, 7,07 µg/kg o menos, 5,32 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 4 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, o 1 µg/kg o menos, de un peso corporal del paciente.

25 En una realización preferida, la dosificación de conjugado de la invención administrada a un sujeto para tratar, prevenir y/o gestionar cáncer en un paciente es una dosis de 4 µg/kg, 5,32 µg/kg, 7,07 µg/kg, 9,4 µg/kg, o 12,5 µg/kg, del peso corporal del sujeto, administrada tres veces a la semana, durante un periodo de dos semanas.  
30 En un aspecto específico de esta realización, el conjugado de la invención se administra cada día durante cinco días. En otras realizaciones, la dosificación puede repetirse durante múltiples ciclos, en las que el número de ciclos elegido puede o puede no tener en cuenta la medición de anticuerpos anti-DT en el paciente.

35 En otra realización específica, la dosificación de un conjugado de la invención administrada a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar el cáncer en un paciente es una dosis unitaria de 0,1 µg a 20 µg, 0,1 µg a 15 µg, 0,1 µg a 12 µg, 0,1 µg a 10 µg, 0,1 µg a 8 µg, 0,1 µg a 7 µg, 0,1 µg a 5 µg, 0,1 a 2,5 µg, 0,25 µg a 20 µg, 0,25 a 15 µg, 0,25 a 12 µg, 0,25 a 10 µg, 0,25 a 8 µg, 0,25 µg a 7 µg, 0,25 µg a 5 µg, 0,5 µg a 2,5 µg, 1 µg a 20 µg, 1 µg a 15 µg, 1 µg a 12 µg, 1 µg a 10 µg, 1 µg a 8 µg, 1 µg a 7 µg, 1 µg a 5 µg, o 1 µg a 2,5 µg.

40 En una realización específica, la dosificación de un conjugado de la invención administrada a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar el cáncer en un paciente está en el intervalo de 0,01 a 10 g/m<sup>2</sup>, y más normalmente, en el intervalo de 0,1 g/m<sup>2</sup> a 7,5 g/m<sup>2</sup>, del área superficial del cuerpo del sujeto. En una realización, la dosificación administrada a un sujeto está en el intervalo de 0,5 g/m<sup>2</sup> a 5 g/m<sup>2</sup>, o 1 g/m<sup>2</sup> a 5 g/m<sup>2</sup> del área superficial del cuerpo del sujeto.

45 En otras realizaciones, el régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz comprende administrar a un paciente una o más dosis de una cantidad eficaz de un conjugado de la invención, en las que la dosis de una cantidad eficaz logra un nivel en plasma de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml, o al menos 400 µg/ml del compuesto de la invención.

50 En otras realizaciones, el régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz comprende administrar a un paciente una pluralidad de dosis de una cantidad eficaz de un conjugado de la invención, en las que la pluralidad de dosis mantiene un nivel en plasma de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,15 µg/ml, al menos 0,17 µg/ml, al menos 0,2 µg/ml, al menos 0,23 µg/ml, al menos 0,25 µg/ml, al menos 0,3 µg/ml, al menos 0,34 µg/ml, al menos 0,4 µg/ml, al menos 0,45 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml,  
55 al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 g/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml, o al menos 400 µg/ml del compuesto de la invención durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4

meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, o 24 meses.

5 En otra realización, la presente invención engloba regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces en las que una cantidad de conjugado DT-IL3 se administra a un paciente para lograr niveles en plasma de conjugado DT-IL3 en el intervalo de al menos 0,1 µg/ml a al menos 20 µg/ml; al menos 0,1 µg/ml a al menos 50 µg/ml, al menos 0,1 µg/ml a al menos 100 µg/ml, al menos 0,1 µg/ml a al menos 200 µg/ml, al menos 0,1 µg/ml a al menos 300 µg/ml, al menos 0,1 µg/ml a al menos 400 µg/ml, al menos 0,1 µg/ml a al menos 500 µg/ml, al menos 0,1 µg/ml a al menos 600 µg/ml, al menos 0,1 µg/ml a al menos 700 µg/ml, o al menos 0,1 µg/ml a al menos 800 µg/ml durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, o 24 meses.

En algunas realizaciones, la respuesta de un paciente a un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz se monitoriza y el régimen se mantiene o ajusta basándose en una comparación con un punto de referencia y/o modelo. En una realización, el régimen se mantiene o ajusta basándose en la monitorización de células cancerosas. En otra realización, el régimen se mantiene o ajusta basándose en la monitorización de células madre de cáncer.

15 En realizaciones específicas, la respuesta del paciente a un régimen de tratamiento se monitoriza mediante la recogida y análisis de una muestra del paciente tal como, pero no se limita a, una muestra biológica, por ejemplo, la sangre del paciente, médula ósea, tejido normal, o biopsia de tumor. En una realización, el punto de referencia y/o modelo comprende datos farmacocinéticos o de respuesta inmunitaria del paciente que recibe la terapia, en la que los datos se recogen en un momento de tiempo anterior (por ejemplo, antes de recibir el régimen, como una muestra de referencia del nivel inicial, o en un momento de tiempo anterior mientras que se recibe la terapia). En otra realización, el punto de referencia y/o modelo es de un paciente sano no afectado por el cáncer. En una realización preferida, el punto de referencia es de un paciente que ha logrado la remisión de cáncer del mismo tipo que el paciente que recibe tratamiento.

25 En ciertas realizaciones, la respuesta de un paciente a un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz se monitoriza midiendo concentraciones en suero o plasmáticas de un conjugado de la invención con el tiempo. En algunas realizaciones, el régimen profiláctico y/o terapéutico se ajusta como resultado de los datos farmacocinéticos obtenidos. Por ejemplo, pueden ajustarse la frecuencia y/o dosificación administrada al paciente. En algunas realizaciones, la respuesta de un paciente a un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz se monitoriza evaluando la respuesta inmunitaria del paciente al conjugado administrado al paciente. En una realización específica, se monitoriza el título de anticuerpos anti-toxina diftérica (anti-DT) del paciente. Pueden variarse varios aspectos del régimen basándose en la comparación que incluye, pero no se limita a, la dosificación y frecuencia de administración y el régimen de administración temporal.

30 En algunas realizaciones, el título de anticuerpos anti-DT en un paciente se mide antes de la administración de un conjugado de la invención. El título de anticuerpos anti-DT pretratamiento puede considerarse en la determinación de la elegibilidad de un paciente para recibir un conjugado de la invención, o el régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz administrado al paciente. Por ejemplo, un título de anticuerpos anti-DT del paciente puede sugerir la administración de un conjugado de la invención a una dosificación particular, a una frecuencia particular y/o durante un cierto periodo de tiempo.

35 En algunas realizaciones, el régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz comprende la administración de un conjugado de la invención en combinación con uno o más terapéuticos contra el cáncer adicionales. Véase la Sección 5.3.2. Preferentemente, las dosificaciones del uno o más terapéuticos contra el cáncer adicionales usados en la terapia de combinación son inferiores a aquellas que han sido o están actualmente siendo usadas para prevenir, tratar y/o gestionar el cáncer. Las dosificaciones recomendadas del uno o más terapéuticos contra el cáncer adicionales actualmente usados para la prevención, tratamiento y/o gestión del cáncer pueden obtenerse de cualquier referencia en la materia que incluye, pero no se limita a, Hardman et al., eds., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics, 10th ed., Mc-Graw-Hill, New York, 2001; Physician's Desk Reference (60th ed., 2006), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

40 El conjugado de la invención y el uno o más terapéuticos contra el cáncer adicionales pueden administrarse por separado, simultáneamente, o secuencialmente. En diversas realizaciones, el compuesto de la invención y la terapéutico contra el cáncer adicional se administran separados menos de 5 minutos, separados menos de 30 minutos, separados menos de 1 hora, separados aproximadamente 1 hora, separados aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas, separados aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, separados aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas, separados aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas, separados aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas, separados aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas, separados aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas, separados aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas, separados aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas, separados aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas, separados aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas, separados aproximadamente 12 horas a 18 horas, separados 18 horas a 24 horas, separados 24 horas a 36 horas, separados 36 horas a 48 horas, separados 48 horas a 52 horas, separados 52 horas a 60 horas, separados 60 horas a 72 horas, separados 72 horas a 84 horas, separados 84 horas a 96 horas, o

separados 96 horas a 120 horas. En realizaciones preferidas, dos o más terapéuticos contra el cáncer se administran dentro de la misma visita del paciente.

5 En ciertas realizaciones, el conjugado de la invención y el terapéutico contra el cáncer adicional se administran cíclicamente. La terapia de ciclos implica la administración de un terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de un segundo terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a uno o ambos de los terapéuticos contra el cáncer, para evitar o reducir los efectos secundarios de uno o ambos de los terapéuticos contra el cáncer, y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

10 En una realización preferida, los terapéuticos contra el cáncer se administran simultáneamente a un sujeto en composiciones separadas. Los terapéuticos contra el cáncer de combinación de la invención pueden administrarse a un sujeto por las mismas vías de administración o diferentes.

15 En una realización específica, la terapia de ciclos implica la administración de un primer terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de un segundo terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, opcionalmente, seguido de la administración de un tercer terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, etc., y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a uno de los terapéuticos contra el cáncer, para evitar o reducir los efectos secundarios de uno de los terapéuticos contra el cáncer, y/o para mejorar la eficacia de los terapéuticos contra el cáncer.

20 Cuando un conjugado de la invención y el terapéutico contra el cáncer adicional se administran a un sujeto simultáneamente, el término "simultáneamente" no se limita a la administración de los terapéuticos contra el cáncer en exactamente el mismo tiempo, sino que se indica que se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que puedan actuar juntos (por ejemplo, sinérgicamente para proporcionar un beneficio aumentado que si se administran de otro modo). Por ejemplo, los terapéuticos contra el cáncer pueden administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos en el tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente próximos en el tiempo de manera que se proporcione el efecto terapéutico deseado, preferentemente en un modo sinérgico. Los terapéuticos contra el cáncer de combinación de la invención pueden administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. Cuando los componentes de los terapéuticos contra el cáncer de combinación no se administran en la misma composición farmacéutica, se entiende que pueden administrarse en cualquier orden a un sujeto en necesidad del mismo. Por ejemplo, un conjugado de la invención puede administrarse antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), concomitantemente con, o posterior a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) de la administración del terapéutico contra el cáncer adicional, a un sujeto en necesidad del mismo. En diversas realizaciones, los terapéuticos contra el cáncer se administran separados 1 minuto, separados 10 minutos, separados 30 minutos, separados menos de 1 hora, separados 1 hora, separados 1 hora a 2 horas, separados 2 horas a 3 horas, separados 3 horas a 4 horas, separados 4 horas a 5 horas, separados 5 horas a 6 horas, separados 6 horas a 7 horas, separados 7 horas a 8 horas, separados 8 horas a 9 horas, separados 9 horas a 10 horas, separados 10 horas a 11 horas, separados 11 horas a 12 horas, separados no más de 24 horas, o separados no más de 48 horas. En una realización, los terapéuticos contra el cáncer se administran dentro de la misma visita a la consulta. En otra realización, los terapéuticos contra el cáncer de combinación de la invención se administran separados 1 minuto a 24 horas.

### **5.3.2 TIPOS DE ENFERMEDADES Y TRASTORNOS**

45 La presente divulgación proporciona métodos de tratamiento o de prevención o de gestión de una enfermedad o trastorno caracterizado por células que expresan la subunidad beta del receptor de IL-3 en seres humanos administrando a seres humanos en necesidad de tal tratamiento o prevención una composición farmacéutica que comprende una cantidad de conjugado de IL-3-toxina diftérica de la invención eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno no es un cáncer hematológico. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno es una enfermedad alérgica o trastorno. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno es una enfermedad inflamatoria o trastorno. En otra realización, la enfermedad o trastorno es uno caracterizado por afectar las células dendríticas plasmacitoides (por ejemplo, cánceres de células dendríticas tales como leucemia blástica de NK y neoplasia dermatológica de CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). En ciertas realizaciones, los sujetos tienen leucemia mielógena aguda (LMA). En ciertas otras realizaciones, los sujetos tienen síndrome mielodisplásico (SMD). En otras realizaciones, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), LMC, LLA, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.

60 La presente invención engloba métodos de prevención, tratamiento, gestión y/o mejora de un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas del mismo como una alternativa a otras terapias convencionales. En realizaciones específicas, el paciente que es gestionado o tratado según los métodos de la invención es resistente a otras terapias o es susceptible a reacciones adversas de tales terapias. El paciente puede ser una persona con un sistema inmunitario deprimido (por ejemplo, pacientes posoperatorios, pacientes en quimioterapia y pacientes con enfermedad de



inmunodeficiencia, pacientes con displasia broncopulmonar, pacientes con enfermedad cardíaca congénita, pacientes con fibrosis quística, pacientes con enfermedad cardíaca adquirida o congénita, y pacientes que padecen una infección), una persona con función renal o hepática alterada, ancianos, niños, lactantes, lactantes nacidos prematuramente, personas con trastornos neuropsiquiátricos o aquellos que toman fármacos psicotrópicos, personas con historias de convulsiones, o personas en medicación que interaccionaría negativamente con los agentes convencionales usados para prevenir, gestionar, tratar o mejorar una infección respiratoria viral o uno o más síntomas de la misma.

En una realización de la invención, se dirige a enfermedades que se caracterizan por células dendríticas plasmacitoides, células que demuestran alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-3. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, VIH, herpes, CMV, enfermedades autoinmunitarias y cánceres que incluyen, pero no se limitan a, linfoma blástico de NK, cáncer de células dendríticas que incluye cáncer de células dendríticas plasmacitoides y neoplasias dermatológicas.

### **TRASTORNOS AUTOINMUNITARIOS**

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un método de prevención, tratamiento, gestión y/o mejora de un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad del mismo una dosis de una cantidad eficaz de una o más composiciones farmacéuticas de la invención, en los que las células implicadas en tales trastornos expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3. En los trastornos autoinmunitarios, el sistema inmunitario desencadena una respuesta inmunitaria y el sistema inmunitario del cuerpo normalmente protector produce daño a sus propios tejidos auto-atacándolos accidentalmente. Hay muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan el cuerpo en diferentes formas. Por ejemplo, el cerebro es afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino es afectado en individuos con enfermedad de Crohn, y el sinovio, hueso y cartílago de diversas articulaciones son afectados en individuos con artritis reumatoide. A medida que avanzan los trastornos autoinmunitarios, pueden resultar la destrucción de uno o más tipos de tejidos del cuerpo, crecimiento anormal de un órgano, o cambios en la función del órgano. El trastorno autoinmunitario puede afectar solo un órgano o tipo de tejido o puede afectar múltiples órganos y tejidos. Órganos y tejidos comúnmente afectados por los trastornos autoinmunitarios incluyen glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conjuntivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, la tiroides o páncreas), músculos, articulaciones y piel.

Ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden ser prevenidos, tratados, gestionados y/o mejorados por los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, resistencia a fármacos adrenérgicos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, encefalomielitis alérgica, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, síndrome de cardiotomía, celiacía-dermatitis, hepatitis activa crónica, síndrome de fatiga crónica-disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, enfermedad de depósitos densos, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), enteropatía sensible al gluten, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, hipertiroidismo (es decir, tiroiditis de Hashimoto), fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de Addison idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, miocarditis, diabetes mellitus de tipo 1 o mediada por inmunidad, neuritis, otro fallo de las glándulas endocrinas, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policrondritis, poliendocrinopatías, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, post-IM, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, policondritis recidivante, síndrome de Reiter, enfermedad cardíaca reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, urticaria, uveítis, oftalmía por uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme-vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

### **ALERGIAS**

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método de prevención, tratamiento, gestión y/o mejora de una o más enfermedades alérgicas o alergias o uno o más síntomas de las mismas, en las que las células implicadas en tales enfermedades o alergias expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad del mismo una dosis de una cantidad eficaz de una o más composiciones farmacéuticas de la invención. Las reacciones alérgicas mediadas por inmunidad (hipersensibilidad) se clasifican en cuatro tipos (I-IV) según los mecanismos subyacentes que conducen a la manifestación de los síntomas alérgicos. Las reacciones alérgicas de tipo I son reacciones de hipersensibilidad inmediatas caracterizadas por la liberación mediada por IgE de sustancias vasoactivas tales como histamina de mastocitos y basófilos. Durante horas, los mastocitos y basófilos liberan citocinas proinflamatorias que producen la vasodilatación, elevada permeabilidad capilar, hipersecreción glandular, espasmo de músculo liso e infiltración de tejido con eosinófilos y otras células inflamatorias.

Las reacciones alérgicas de tipo II son reacciones de hipersensibilidad citotóxicas e implican a anticuerpos IgG o IgM unidos a antígenos de superficie celular con posterior fijación del complemento. Ciertas células citotóxicas, tales como linfocitos T citolíticos o macrófagos, se activan, se unen a células recubiertas con IgG y destruyen las células diana. Las reacciones de tipo II puede producir citólisis o daño al tejido.

- 5 Las reacciones de tipo III son reacciones inmuno-complejas resultantes de depósitos de complejos inmunitarios de antígeno-anticuerpo circulantes en vasos sanguíneos o tejidos. La inflamación aguda resulta del complejo inmunitario que inicia una secuencia de eventos que produce la migración de células polimorfonucleares y la liberación de enzimas proteolíticas lisosómicas y factores de permeabilidad en tejidos.

- 10 Las reacciones de tipo IV son reacciones de hipersensibilidad retardada producidas por linfocitos T sensibilizados después del contacto con un antígeno específico. Los linfocitos T sensibilizados activados producen lesión inmunológica por efecto tóxico directo o mediante la liberación de linfocinas y otras sustancias solubles. Los linfocitos T activados pueden también liberar citocinas que afectan la actividad de macrófagos, neutrófilos y linfocitos citolíticos linfoides.

- 15 Las reacciones alérgicas pueden ser inmediatas, de fase tardía, o crónicas. La exposición continua o crónica a un alérgeno puede producir inflamación alérgica crónica. Los tejidos de sitios de inflamación crónica contienen eosinófilos y linfocitos T que liberan mediadores que pueden producir daño al tejido, elevada inflamación y elevada sensibilidad.

- 20 Actualmente, las reacciones alérgicas se tratan con fármacos tales como antihistamínicos, corticosteroides, vasodilatadores, broncodilatadores, inhibidores de leucotrieno, e inmunomoduladores que intentan aliviar los síntomas asociados a la reacción alérgica.

### **CÁNCER**

- Cualquier tipo de cáncer en el que las células madre cancerosas o células cancerosas expresen las subunidades beta y/o alfa del receptor de interleucina-3 puede ser prevenido, tratado y/o gestionado según la invención. Ejemplos no limitantes de cánceres que pueden ser prevenidos, tratados y/o gestionados según la invención incluyen:
- 25 leucemias, tales como, pero no se limitan a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y eritroleucemia y síndrome mielodisplásico; leucemias crónicas, tales como, pero no se limitan a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia verdadera; linfomas tales como, pero no se limitan a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero no se limitan a,
- 30 mieloma múltiple ardiente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de las cadenas pesadas; cáncer de células dendríticas, que incluye cáncer de células dendríticas plasmacitoides, linfoma blástico de NK (también conocido como linfoma cutáneo de NK/linfocitos T y neoplasias dermatológicas agranulares (CD4+/CD56+));
- 35 leucemia basófila; sarcomas de hueso y tejido conjuntivo tales como, pero no se limitan a, sarcoma de huesos, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma del periostio, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no de la glía, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma,
- 40 meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero no se limita a, carcinoma ductal, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal tal como, pero no se limita a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero no se limita a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático tal como, pero no se limita a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres pituitarios tales como, pero limitados a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares tales como, pero no se limitan a, melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma de cuerpos ciliares, y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar tal como carcinoma de células escamosas,
- 45 melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino tales como pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como, pero no se limitan a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como, pero no se limitan a, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinativas y tumor de estroma; cánceres de esófago tales como, pero no se limitan a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células en avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como, pero no se limitan a, adenocarcinoma, fungante (polipoide) y ulcerado, de diseminación superficial, de diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado
- 60 tales como, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de la vesícula biliar tales

como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como, pero no se limitan a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares tales como, pero no se limitan a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico),  
 5 espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma por teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata tales como, pero no se limitan a, neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rhabdomiomasarcoma; cánceres de pene; cánceres de boca tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivales tales como, pero no se limitan a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe tales  
 10 como, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, y verrugoso; cánceres de piel tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno por lentigo, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/ o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como, pero no se limitan a,  
 15 carcinoma de células escamosas, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de tales trastornos, véase Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces también son útiles en el tratamiento, prevención y/o gestión de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales en las que las células de tales enfermedades expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, que incluyen (pero no se limitan a) los  
 25 siguientes: carcinoma, que incluye el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; que incluye carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mielocítico, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomiomasarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma, rhabdomiomasarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. En algunas realizaciones, los cánceres asociados a aberraciones en la apoptosis se previenen, tratan y/o gestionan según los métodos de la invención. Tales cánceres pueden incluir, pero  
 30 no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones p53, tumores dependientes de hormonas de la mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar, y síndromes mielodisplásicos. En realizaciones específicas, el tumor maligno o cambios desproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos de la piel, pulmón, hígado, hueso, cerebro, estómago, colon, mama, próstata, vejiga, riñón, páncreas, ovario y/o útero se previenen, tratan y/o gestionan según los métodos de la invención. En otras realizaciones específicas, se previene, trata y/o gestiona un sarcoma, melanoma o leucemia según los métodos de la invención. En ciertas realizaciones, los sujetos tienen leucemia mielógena aguda (LMA). En ciertas otras realizaciones, los sujetos tienen síndrome mielodisplásico (SMD). En otras realizaciones, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). En otras realizaciones específicas, el síndrome mielodisplásico se previene, trata y/o gestiona según los métodos de la invención.  
 40  
 45

### 5.3.3 POBLACIONES DE PACIENTES DIANA

Según la invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran a seres humanos en necesidad de inhibición de células que expresan la subunidad alfa (en realizaciones específicas, las subunidades alfa y beta) de interleucina-3. En ciertas realizaciones, el crecimiento de tales células se inhibe. En otras  
 50 realizaciones, los conjugados de la presente invención se administran a seres humanos con enfermedades y trastornos asociados a la expresión en exceso del receptor de IL-3. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene leucemia mielocítica. En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno es una enfermedad alérgica o trastorno. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmunitaria. En ciertas realizaciones, los sujetos tienen leucemia mielógena aguda (LMA). En ciertas otras realizaciones, los sujetos tienen síndrome mielodisplásico (SMD). En otras realizaciones, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).  
 55

Según la invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran a sujetos que desarrollan, desarrollaron o se espera que desarrollen (por ejemplo, sujetos con una predisposición genética para un tipo particular de cáncer, sujetos que han sido expuestos a un carcinógeno, sujetos con cáncer recientemente diagnosticado, sujetos que han fracasado en el tratamiento para cáncer, sujetos que han recaído del cáncer, o  
 60 sujetos que están en remisión de un cáncer particular). Tales sujetos pueden o pueden no haber sido previamente tratados para el cáncer o pueden estar en remisión, recaída, o pueden haber fracasado al tratamiento. Tales pacientes pueden también tener citogenética anormal. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse como cualquier línea de terapia del cáncer, por ejemplo, una primera línea, segunda línea, o tercera línea de terapia del

5 cáncer. En una realización específica, el sujeto que va a recibir o que recibe una composición farmacéutica de la invención está recibiendo o ha recibido otras terapias para el cáncer. En otra realización, el sujeto que va a recibir una composición farmacéutica de la invención está recibiendo otras terapias para el cáncer y las composiciones farmacéuticas de la invención se administran al sujeto antes de que se produzca cualquier efecto adverso o intolerancia de estas otras terapias para el cáncer. En una realización alternativa, el sujeto que va a recibir o que recibe una composición farmacéutica de la invención no ha recibido o no está recibiendo otras terapias para el cáncer.

10 En una realización específica, el sujeto ha sido diagnosticado con cáncer usando técnicas conocidas para un experto en la materia que incluyen, pero no se limitan a, examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen de mama, examen de los ganglios linfáticos, examen abdominal, supervisión de la piel, palpación general), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), análisis citológicos vaginales PAP (cáncer de cuello uterino), análisis de guayacol en heces, análisis de sangre (por ejemplo, prueba de hemograma completo (CBC), prueba del antígeno específico de la próstata (PSA), prueba del antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba del antígeno del cáncer (CA)-125, alfa-fetoproteína (AFP), pruebas de la función hepática), análisis de cariotipificación, análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de tumores malignos hematológicos), histología, citometría de flujo, citología, un análisis de esputo, y métodos de obtención de imágenes (por ejemplo, tomografía computerizada (CT), imagen por resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, obtención de imágenes de rayos X, mamografía, barridos de PET, barridos de radionúclidos, gammagrafías óseas). Los sujetos pueden o pueden no haber sido previamente tratados para el cáncer.

20 En una realización, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto que se está sometiendo o se ha sometido a cirugía para eliminar una neoplasia tumoral. En una realización específica, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto simultáneamente o tras la cirugía para eliminar un tumor o neoplasia. En otra realización, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto antes de la cirugía para eliminar un tumor o neoplasia y, en algunas realizaciones, durante y/o después de la cirugía.

25 En una realización, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto después de un ciclo de terapia con el objetivo de destruir las células cancerosas. En algunas realizaciones, el ciclo de terapia implica la administración de dosis en bolo de agentes quimioterapéuticos y/o dosis en bolo de radioterapia. En una realización específica, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto después de que el sujeto haya recibido un ciclo de terapia que implica una dosis que es, o está por debajo de, la máxima dosis tolerada o la dosis de nivel de efectos adversos no observados de uno o más agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia.

30 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto como una alternativa a la quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía, terapia de moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia epigenética, radioinmunoterapia, terapia dirigida y/o terapia biológica que incluye inmunoterapia donde la terapia ha demostrado ser o puede demostrar ser demasiado tóxica, es decir, produce efectos secundarios inaceptables o insoportables para el sujeto. En algunas realizaciones, un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz se administra a un sujeto que es susceptible a reacciones adversas de otras terapias para el cáncer. El sujeto puede, por ejemplo, tener un sistema inmunitario deprimido (por ejemplo, pacientes posoperatorios, pacientes de quimioterapia y pacientes con enfermedad de inmunodeficiencia), tener una función renal o hepática alterada, ser anciano, ser un niño, ser un lactante, tener un trastorno neuropsiquiátrico, tomar un fármaco psicotrópico, tener una historia de convulsiones, o estar con medicación que interaccionaría negativamente con las terapias para el cáncer.

40 En una realización específica, una composición farmacéutica de la invención se administra a sujetos que recibirán, están recibiendo o han recibido radioterapia. Entre estos sujetos están aquellos que han recibido quimioterapia, terapia hormonal, terapia de moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia dirigida, radioinmunoterapia, terapia epigenética y/o terapia biológica, que incluyen inmunoterapia, además de aquellos que se han sometido a cirugía.

45 En otra realización, una composición farmacéutica de la invención se administra a sujetos que recibirán, están recibiendo o han recibido terapia hormonal y/o terapia biológica, que incluye inmunoterapia. Entre estos sujetos están aquellos que han recibido quimioterapia, terapia de moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia dirigida, radioinmunoterapia, terapia epigenética y/o radioterapia, además de aquellos que se han sometido a cirugía.

50 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto resistente a una o más terapias. En una realización, que un cáncer es resistente a una terapia significa que al menos alguna porción significativa de las células cancerosas no es destruida o su división celular no es detenida. La determinación de si las células cancerosas son resistentes puede hacerse o bien *in vivo* o *in vitro* por cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia de una terapia en células cancerosas, usando los significados aceptados en la materia de "resistente" en un contexto tal. En diversas realizaciones, un cáncer es resistente donde la cantidad de células cancerosas no ha sido significativamente reducida, o ha aumentado. En otras realizaciones, que un cáncer es resistente significa que al menos alguna porción significativa de las células madre cancerosas no se han

destruido o detenido su división celular. La determinación de si las células madre cancerosas son resistentes puede hacerse o bien *in vivo* o *in vitro* por cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra para invertir la resistencia a, o aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a ciertos agentes hormonales, de radiación y quimioterapéuticos, volviendo así a sensibilizar las células cancerosas a uno o más de estos agentes, que pueden entonces administrarse (o continuar administrándose) para tratar o gestionar el cáncer, que incluye prevenir metástasis. En una realización específica, los regímenes de la invención se administran a pacientes con elevados niveles de citocina IL-6, que se ha asociado al desarrollo de resistencia de células cancerosas a diferentes regímenes de tratamiento, tales como quimioterapia y terapia hormonal.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto con un recuento de linfocitos absoluto medio de al menos aproximadamente 400 células/mm<sup>3</sup>, al menos 500 células/mm<sup>3</sup>, al menos aproximadamente 600 células/mm<sup>3</sup>, al menos aproximadamente 700 células/mm<sup>3</sup>, al menos aproximadamente 800 células/mm<sup>3</sup>, al menos aproximadamente 900 células/mm<sup>3</sup>, al menos aproximadamente 1000 células/mm<sup>3</sup>, al menos aproximadamente 1100 células/mm<sup>3</sup>, al menos aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>. En otras realizaciones, un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz de la invención se administra a un sujeto con un recuento de linfocitos absoluto medio de aproximadamente 400 células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>, aproximadamente 500 células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>, aproximadamente 600 células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>, aproximadamente 700 células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>, aproximadamente 800 células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>, aproximadamente 900 células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>, aproximadamente 1000 células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 1200 células/mm<sup>3</sup>. En una realización más específica, el régimen produce un recuento de linfocitos absoluto medio de al menos aproximadamente 400 células/mm<sup>3</sup>.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto que está en remisión. En una realización específica, el sujeto no tiene cáncer detectable, es decir, ningún cáncer es detectable usando un método convencional descrito en el presente documento (por ejemplo, IRM) o conocido para un experto en la materia. En otra realización, una composición farmacéutica de la invención se administra a un paciente que no tiene una respuesta inmunitaria detectable a toxina diftérica. En una realización preferida, la respuesta inmunitaria se detecta por ELISA.

#### 5.3.4 TERAPIAS DE COMBINACIÓN

La presente divulgación también proporciona métodos de prevención, tratamiento y/o gestión de cáncer, comprendiendo los métodos administrar a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) en necesidad de los mismos un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz, comprendiendo el régimen administrar al paciente una composición farmacéutica de la invención y una o más terapias adicionales, no siendo dicha terapia adicional un conjugado de la invención. En una realización específica, las terapias de combinación de la invención comprenden una composición farmacéutica según la invención y al menos otra terapia que tiene el mismo mecanismo de acción que dicho conjugado. En otra realización específica, las terapias de combinación de la invención comprenden una composición farmacéutica identificada según los métodos de la invención y al menos otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente que dicho conjugado. La composición farmacéutica de la invención y la terapia adicional pueden administrarse por separado, simultáneamente, o secuencialmente. La combinación de agentes puede actuar aditivamente o sinérgicamente. Las terapias de combinación de la presente invención reducen los efectos secundarios asociados a las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos).

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse a un sujeto por las mismas vías de administración o diferentes.

Cualquier terapia (por ejemplo, agente terapéutico o profiláctico) que sea útil, se ha usado, o está actualmente siendo usada para la prevención, tratamiento y/o gestión del cáncer puede usarse en composiciones y métodos de la invención. Terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos) incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, conjugados, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Ejemplos no limitantes de terapias para el cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía, terapia de moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia epigenética, radioinmunoterapia, terapia dirigida y/o terapia biológica que incluye inmunoterapia. En ciertas realizaciones, un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz de la invención comprende la administración de una combinación de terapias.

Ejemplos de terapias para el cáncer incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antraciclina; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina (Vidaza); azetepa; azotomicina; batimastat;

benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bisfosfonatos (por ejemplo, pamidronato (Aredria), clodronato de sodio (Bonefos), ácido zoledrónico (Zometa), alendronato (Fosamax), etidronato, ibandronato, cimadronato, risedromato y tiludromato); bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina (Ara-C); dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina (Dacogen); agentes de desmetilación, dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; inhibidores de EphA2; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; fluxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; fluocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; inhibidores de histona desacetilasa (HDACs); clorhidrato de gemcitabina; hidroxiaurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; mesilato de imatinib (Gleevec); interleucina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; ioproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; lenalidomida (Revlimid); letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, sipilizumab (MedImmune Inc.; publicación internacional N.º WO 02/098370, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad)); acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipsulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; roglitimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temporfin; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina.

Otros ejemplos de terapias para el cáncer incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25-dihidroxitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética anti-dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastona; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de los genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosarina; derivados de beta-lactama; beta-aletina; beta-clamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilpermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 del virus de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasas (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diacuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, dioxamicina; difenilespiomustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; inhibidores de la HMG CoA reductasa (por ejemplo, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lescol, lupitor, lovastatina, rosuvastatina y simvastatina); hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandronico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor de los receptores del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol, 4-iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplaquinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos;

leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; LFA-3TIP (Biogen, Cambridge, MA; publicación internacional N.º WO 93/0686 y patente de EE.UU. N.º 6.162.432); liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos lífticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteína de matriz; menogarilo; merbarona; meterilina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario de emparejamiento incorrecto; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+estreptocinasa de pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor de los genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en multisupresor tumoral 1; antineoplásico de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicena; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palaumina; palmitoilirizoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; paceliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosán sódico; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida, alcohol perillíco; fenacinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor de los activadores del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfimer sódico; porfirocicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de proteína cinasa C; inhibidores de proteína cinasa C, microalga; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno y hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión a antígenos monocatenaria; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico, solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicarnicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastina 1; escualamina; inhibidor de citoblastos; inhibidores de la división de citoblastos; estipiamicina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista de los péptidos intestinales vasoactivos superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; 5-fluorouracilo; leucovorina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista de receptores de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de la tiroides; etiopurpurina de etilo de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de citoblastos totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina cinasas; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas de receptores de urocinasa; vapreotida; variolina B; sistema vectorial, terapia génica de eritrocitos; talidomida; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; VITAXIN™ (véase la publicación de patente de EE.UU. N.º US 2002/0168360 A1, con fecha 14 de noviembre de 2002, titulado "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin  $\alpha\beta 3$  Antagonists in Combination With Other Prophylactic or Therapeutic Agents"); vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb y zinostatina estimalámero.

Una lista no limitante de compuestos que podrían usarse para dirigir las células madre cancerosas incluye: inhibidores del receptor de interleucina-3 (IL-3R) y CD123 (incluyendo péptidos, conjugados de péptido, anticuerpos, conjugados de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, y conjugados de fragmento de anticuerpo que se dirigen a IL-3R o CD123); cantaridina; norcantaridina y análogos y derivados de la misma; inhibidores de la vía Notch que incluyen inhibidores de gamma-secretasa; inhibidores de la vía de sonic hedgehog/suavizada que incluyen ciclopamina y análogos de la misma; anticuerpos para CD96; ciertos inhibidores de NF- $\kappa$ B/proteasoma que incluyen partenolida y análogos de la misma; ciertos triterpenos que incluyen celastrol; ciertos inhibidores de mTOR; compuestos y anticuerpos que se dirigen al receptor de urocinasa; sinefungina; ciertos inhibidores de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH); agonistas y antagonistas de PPAR-alfa y PPAR-gamma (incluyendo pioglitazona, tesaglitazar, muraglitazar, pelaglitazar, lobeglitazona, balaglitazona, ragaglitazar, rosiglitazona, farglitazar, sodelglitazar, reglitazar, naveglitazar, oxeglitazar, metaglitazán, netoglitazona, darglitazona, englitazona, tiazolidinadonas, aleglitazar, edaglitazona, rivoglitazona, troglitazona, imiglitazar y sipoglitazar); inhibidores de la telomerasa; anticuerpos para EpCAM (ESA); agonistas y antagonistas de GSK-3 beta (incluyendo litio, 6-bromoinirubin-3'-oxima (BIO), TDZD8); inhibidores de la vía Wnt que incluyen anticuerpos para frizzled o moléculas pequeñas que inhiben dishevelled/frizzled o beta-catenina; anticuerpos anti-CD20 y conjugados (por ejemplo, Rituxan, Bexxar, Zevalin) para el novedoso uso en mieloma múltiple o melanoma; anticuerpo anti-CD133; anticuerpo anti-CD44; anticuerpos para IL-4; ciertos agentes de diferenciación tales como vesnarinona; compuestos que se dirigen a CD33 tales como un anticuerpo o ácido betulínico; compuestos que se dirigen a lactadherina tales como un anticuerpo; moléculas pequeñas o anticuerpos que se dirigen a CXCR4 o SDF-1; moléculas pequeñas o anticuerpos

que se dirigen a bombas multiresistentes; inhibidores de survivina; inhibidores de XIAP; moléculas pequeñas que se dirigen a Bcl-2; anticuerpos para CLL-1; e inhibidores de furina (tales como cucurbitacinas).

Una lista no limitante adicional de compuestos que podrían también usarse para dirigir las células madre cancerosas incluye i) anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y proteínas que están o bien desnudas o conjugadas con un resto terapéutico que se dirige a ciertas dianas de la superficie celular en células madre de cáncer, o ii) moléculas pequeñas conocidas en la técnica que incluyen aquellas que pueden ser adicionalmente optimizadas (por ejemplo, mediante química) o identificadas mediante un cribado basado en células madre de cáncer (por ejemplo, tal como se determinaría si un compuesto alterara o no la proliferación o viabilidad de una célula madre de cáncer mediante métodos convencionales, incluyendo la superficie celular y dianas intracelulares (no pretende ser exhaustiva): Rex1 (Zfp42), CTGF, activina A, Wnt, FGF-2, HIF-1, AP-2 gamma, Bmi-1, nucleostemina, hiwi, Moz-TIF2, Nanog, beta-arrestina-2, Oct-4, Sox2, stella, GDF3, RUNX3, EBAF, TDGF-1, nodal, ZFPY, PTNE, Evi-1, Pax3, Mcl-1, c-kit, Lex-1, Zfx, lactadherina, aldehído deshidrogenasa, BCRP, telomerasa, CD133, Bcl-2, CD26, Gremlin y FoxC2.

En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) en combinación con un compuesto de la invención es un agente inmunomodulador. Ejemplos no limitantes de agentes inmunomoduladores incluyen agentes proteínicos tales como citocinas, peptidomiméticos y anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fvs, scFvs, Fab o F(ab)2 o fragmentos de unión al epítipo), moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos antisentido y hélices triples), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. En particular, los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflamida), moduladores de receptores de linfocitos T, moduladores de receptores de citocinas y moduladores de mastocitos moduladores. Otros ejemplos de agentes inmunomoduladores pueden encontrarse, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. N.º 2005/0002934 A1 en los párrafos 259-275 que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. En una realización, el agente inmunomodulador es un agente quimioterapéutico. En una realización alternativa, el agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador distinto de un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) según la invención no son un agente inmunomodulador.

En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) en combinación con un compuesto de la invención es un agente antiangiogénico. Ejemplos no limitantes de agentes antiangiogénicos incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, conjugados, anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fvs, ScFvs, fragmentos Fab, fragmentos F(ab)2, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos) tales como anticuerpos que se unen específicamente a TNF- $\alpha$ , moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas antisentido o hélices triples), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que reducen o inhiben la angiogénesis. Otros ejemplos de agentes antiangiogénicos pueden encontrarse, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. N.º 2005/0002934 A1 en los párrafos 277-282. En otras realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) según la invención no es un agente antiangiogénico.

En algunas realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) en combinación con un compuesto de la invención es un agente antiinflamatorio. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen cualquier agente antiinflamatorio, que incluye agentes útiles en terapias para trastornos inflamatorios, muy conocidas para un experto en la materia. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, anticolinérgicos (por ejemplo, sulfato de atropina, metilnitrato de atropina y bromuro de ipratropio (ATROVENT™)), beta2-agonistas (por ejemplo, abuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutalina (BRETHAIRE™ y BRETINE™), albuterol (PROVENTIL™ REPETABS™ y VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™) y salmeterol (SEREVENT™ y SEREVENT DISKUS™)) y metilxantinas (por ejemplo, teofilina (UNIPHIL™, THEO-DUR™, SLO-BID™ Y TEHO-42™)). Ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN), etodolaco (LODINA™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketoralaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticosteroides (por ejemplo, metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISON™ y DELTASONE™), prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, e inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Otros ejemplos de agentes antiinflamatorios pueden encontrarse, por ejemplo, en la publicación de EE.UU. N.º 005/0002934 A1 en los párrafos 290-294, que se incorpora por referencia en su totalidad. En otras realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) según la invención no es un agente antiinflamatorio.

En ciertas realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) es un agente alquilante, una nitrosourea, un antimetabolito y antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa II, o un inhibidor mitótico. Agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, busulfán, cisplatino, carboplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, decarbazina, mecloretamina, mefalán y temozolomida. Nitrosoureas incluyen, pero no se limitan a, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU). Antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, capecitabina, metotrexato, gemcitabina, citarabina y



fludarabina. Antraciclinas incluyen, pero no se limitan a, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina y mitoxantrona. Inhibidores de la topoisomerasa II incluyen, pero no se limitan a, topotecán, irinotecán, etopósido (VP-16) y tenipósido. Inhibidores mitóticos incluyen, pero no se limitan a, taxanos (paclitaxel, docetaxel), y los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina).

5 La invención incluye el uso de agentes que se dirigen a las células madre cancerosas en combinación con un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, el agente usado es un agente que se une a un marcador, por ejemplo, antígeno en células madre de cáncer. En una realización específica, el agente se une a un antígeno que se expresa a un mayor nivel en las células madre cancerosas que en células madre normales. En una realización específica, el agente se une específicamente a un antígeno de célula madre de cáncer. En otras realizaciones, la(s) terapia(s) usada(s) según la invención es un agente que se une a un marcador en células madre de cáncer. Ejemplos no limitantes de antígenos en las células madre cancerosas que pueden usarse para dirigirse a las células madre cancerosas incluyen CD34+/CD38-, CD34+/CD38-/CD123+, CD44+/CD24-, CD133+, CD34+/CD10-/CD19-, CD138-/CD34-/CD19+, CD20+, CD133+/RC2+ y CD44+/ $\alpha\beta$ 1hi/C133+. En una realización, el agente que se une a un marcador en las células madre cancerosas es un anticuerpo. En otra realización, el agente que se une a un marcador en las células madre cancerosas es un ligando. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o ligando está unido directamente o indirectamente a un resto terapéutico. Ejemplos no limitantes de restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, un esteroide, citosina arabinósido, fluorouracilo, metotrexato, aminopterina, mitomicina C, demecolcina, etopósido, mitramicina, calicheamicina, CC-1065, clorambucilo o melfalán), radionúclidos, enzimas terapéuticas, citocinas, toxinas que incluyen toxinas derivadas de plantas, toxinas derivadas de hongos, toxina derivada de bacterias (por ejemplo, cadena de ricina A desglucosilada, una proteína inactivadora de ribosomas, alfa-sarcina, aspergilina, restrictocina, una ribonucleasa, una toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas, una endotoxina bacteriana o el resto de lípido A de una endotoxina bacteriana), moduladores del crecimiento y RNasa.

25 Por ejemplo, en una realización específica, el agente se une específicamente al receptor de IL-3 (IL-3R). En algunas realizaciones, el agente que se une a IL-3R es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es específico para IL-3R. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está conjugado o bien químicamente o mediante tecnología recombinante con un resto terapéutico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, una toxina derivada de plantas, hongos o bacterias, un radionúclido) usando un agente de enlace para efectuar una respuesta de destrucción de células. En ciertas realizaciones, el anticuerpo, conjugado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo se une a la subunidad  $\alpha$  de IL-3R (es decir, el antígeno CD123). En otras realizaciones, el anticuerpo, conjugado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo se une a IL-3R, que contiene tanto las subunidades  $\alpha$  como  $\beta$ . Métodos de preparación de anticuerpos para IL-3R y miméticos de anticuerpos para IL-3R se describen en la patente de Estados Unidos N.º 6.733.743 B2.

35 En ciertas realizaciones, anticuerpos o fragmentos que se unen a un marcador en las células madre cancerosas son sustancialmente no inmunogénicos en el sujeto tratado. Anticuerpos no inmunogénicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos quimerizados, anticuerpos humanizados y anticuerpos de la misma especie que el sujeto que recibe la terapia. Anticuerpos o fragmentos que se unen a marcadores en las células madre cancerosas pueden producirse usando técnicas conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, los párrafos 539-573 de la publicación de EE.UU. N.º 2005/0002934 A1.

La invención incluye el uso de agentes que se dirigen a células madre de cáncer. En ciertas realizaciones, el agente actúa solo. En otras realizaciones, el agente está unido directamente o indirectamente a otro resto terapéutico. Ejemplos no limitantes de restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, enzimas terapéuticas, agentes quimioterapéuticos, citocinas, radionúclidos, toxinas, RNasa y antimetabolitos. En algunas realizaciones, el agente usado es un agente que se une a un marcador, por ejemplo, un antígeno en una célula madre de cáncer. En una realización específica, el agente se une a un antígeno que se expresa a un nivel mayor en células madre cancerosas que en células madre normales. En una realización específica, el agente se une específicamente a un antígeno de célula madre de cáncer que no es una célula madre normal. En otras realizaciones, la(s) terapia(s) es un agente que se une a un marcador en células madre de cáncer. En una realización, el agente que se une a un marcador en las células madre cancerosas es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un conjugado de anticuerpo con un resto terapéutico, o un fragmento de anticuerpo conjugado con un resto terapéutico.

En algunas realizaciones, un compuesto de la invención se usa en combinación con radioterapia que comprende el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir las células madre cancerosas y/o células cancerosas. En realizaciones específicas, la radioterapia se administra como radiación de haz externa o teleterapia, en las que la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras realizaciones, la radioterapia se administra como terapia interna o braquiterapia, en la que una fuente radiactiva se pone dentro del cuerpo próxima a células madre de cáncer, células cancerosas y/o una masa tumoral.

En algunas realizaciones, la terapia usada es una terapia basada en proliferación. Ejemplos no limitantes de tales terapias incluyen una quimioterapia y radioterapia como se describen arriba.

Terapias para el cáncer actualmente disponibles y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en bibliografía como tal Physician's Desk Reference (60th ed., 2006). Según la presente invención, las dosificaciones y frecuencia de administración de agentes quimioterapéuticos se describen arriba.

#### 5 **5.4 MÉTODOS DE MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE CÁNCER**

Como parte de los regímenes profilácticamente eficaces y/o terapéuticamente eficaces de la invención, la población de células madre de cáncer puede monitorizarse para evaluar la eficacia de una terapia, además de para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer o la eficacia de un régimen terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En ciertas realizaciones de las terapias o regímenes profilácticamente eficaces y/o terapéuticamente eficaces de la invención, las terapias o regímenes producen una estabilización o reducción en la población de células madre de cáncer en el paciente. En una realización, el sujeto que recibe el régimen se monitoriza para evaluar si el régimen ha producido una estabilización o reducción en la población de células madre de cáncer en el sujeto.

En algunas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en un sujeto se determina usando una técnica muy conocida para un experto en la materia o descrita en la Sección 5.7 a continuación.

Según la invención, las células madre cancerosas comprenden una única subpoblación (frecuentemente 0,1-10 % o así) de un tumor que, a diferencia del 90 % restante o así del tumor (es decir, la masa tumoral), son relativamente más tumorigénicas y de crecimiento relativamente más lento o quiescentes. Dado que las terapias y regímenes convencionales han sido diseñados, en gran parte, para atacar células que proliferan rápidamente (es decir, aquellas células cancerosas que comprenden la masa tumoral), las células madre cancerosas de crecimiento más lento pueden ser relativamente más resistente que la masa tumoral de crecimiento más rápido a las terapias y regímenes convencionales. Esto explicaría otro motivo para el fracaso de los regímenes de tratamiento para oncología estándar para garantizar el beneficio a largo plazo en la mayoría de los pacientes con cánceres de estadio avanzado. En una realización específica, una célula(s) madre de cáncer es la célula fundadora de un tumor (es decir, es el progenitor de las células cancerosas). En algunas realizaciones, una célula(s) madre de cáncer tiene una, dos, tres, o más o todas de las siguiente características o propiedades: (i) puede albergar la capacidad de iniciar un tumor y/o de perpetuar el crecimiento tumoral, (ii) puede estar generalmente relativamente menos mutada que la masa de un tumor (por ejemplo, debido a crecimiento más lento y así menos errores dependientes de la replicación de ADN, reparación de ADN mejorada y/o cambios epigenéticos/no mutagénicos que contribuye a su tumor maligno), (iii) puede tener muchas características de una célula(s) madre normal(es) (por ejemplo, antígeno de superficie celular similar y/o perfil de expresión intracelular, programas de auto-renovación, multirresistencia, un fenotipo inmaduro, etc., característico de células madre normales) y puede derivarse de una célula(s) madre normal(es), (iv) puede ser posiblemente sensible a su microentorno (por ejemplo, las células madre cancerosas pueden ser capaces de ser inducidas para diferenciarse y/o dividirse asimétricamente), (v) puede ser la fuente de metástasis, (vi) puede ser de crecimiento lento o quiescente, (vii) puede ser simétricamente divisora, (viii) puede ser tumorigénica (por ejemplo, como se ha determinado por experimentos de implantación en NOD/SCID), (ix) puede ser relativamente resistente a terapias tradicionales (es decir, quimiorresistente), y (x) puede comprender una subpoblación de un tumor (por ejemplo, con respecto a la masa tumoral).

En otras realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra de un sujeto se determina/evalúa usando una técnica descrita en el presente documento o muy conocida para un experto en la materia. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas y muestras derivadas de una muestra biológica. En ciertas realizaciones, además de la propia muestra biológica o además de material derivado de la muestra biológica tal como células, la muestra usada en los métodos de la presente invención comprende agua añadida, sales, glicerina, glucosa, un agente antimicrobiano, parafina, un agente estabilizante químico, heparina, un anticoagulante, o un agente de tamponamiento. En ciertas realizaciones, la muestra biológica es sangre, suero, orina, médula ósea o líquido intersticial. En otra realización, la muestra es una muestra de tejido. En una realización particular, la muestra de tejido es tejido de mama, cerebro, piel, colon, pulmón, hígado, ovario, pancreático, próstata, renal, hueso o piel. En una realización específica, la muestra de tejido es una biopsia de tejido normal o tumoral. La cantidad de muestra biológica tomada del sujeto variará según el tipo de muestra biológica y el método de detección que va a emplearse. En una realización particular, la muestra biológica es sangre, suero, orina, o médula ósea y la cantidad de sangre, suero, orina, o médula ósea tomada del sujeto es 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 8 ml, 10 ml o más. En otra realización, la muestra biológica es un tejido y la cantidad de tejido tomada del sujeto es inferior a 10 miligramos, inferior a 25 miligramos, inferior a 50 miligramos, inferior a 1 gramo, inferior a 5 gramos, inferior a 10 gramos, inferior a 50 gramos, o inferior a 100 gramos.

Según los métodos de la divulgación, una muestra derivada de una muestra biológica es una en la que la muestra biológica ha sido sometida a una o más etapas de pretratamiento antes de la detección y/o medición de la población de células madre de cáncer en la muestra. En ciertas realizaciones, un fluido biológico se pretrata por centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o por una combinación de tales etapas de pretratamiento. En otras realizaciones, una muestra de tejido se pretrata por congelación, fijación química, incorporación en parafina, deshidratación, permeabilización u homogenización, seguido de centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o por una combinación de tales etapas de pretratamiento. En ciertas realizaciones, la muestra se pretrata eliminando células distintas de células madre o las células madre cancerosas de la muestra, o eliminando

residuos de la muestra antes de la determinación de la cantidad de células madre cancerosas en la muestra según los métodos de la invención.

Las muestras para su uso en los métodos de la presente divulgación pueden ser todas de cualquier sujeto animal, preferentemente mamífero, lo más preferentemente un ser humano. El sujeto del que se obtiene una muestra y se utiliza según los métodos de la presente invención incluye, sin limitación, un sujeto asintomático, un sujeto que manifiesta o que presenta 1, 2, 3, 4, o más síntomas de cáncer, un sujeto clínicamente diagnosticado como que tiene cáncer, un sujeto predispuesto al cáncer, un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, un sujeto que recibe la terapia para el cáncer, un sujeto que ha sido médicamente determinado que está libre de cáncer (por ejemplo, tras la terapia para el cáncer), un sujeto que está gestionando el cáncer, o un sujeto que no ha sido diagnosticado con el cáncer. En ciertas realizaciones, el término "no tiene cáncer detectable", como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto o sujetos en los que no es detectable cáncer usando un método convencional descrito en el presente documento (por ejemplo, IRM) o conocido para un experto en la materia. En otras realizaciones, el término se refiere a un sujeto o sujetos libres de cualquier trastorno.

En ciertas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en un sujeto o una muestra de un sujeto se evalúa antes de la terapia o régimen (por ejemplo, en el nivel inicial) o al menos 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 30, 60, 90 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, > 12 meses después de que el sujeto empiece a recibir la terapia o régimen. En ciertas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas se evalúa después de un cierto número de dosis (por ejemplo, después de 2, 5, 10, 20, 30, o más dosis de una terapia). En otras realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas se evalúa después de 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más después de recibir una o más terapias.

En ciertas realizaciones, una muestra de control positivo o negativo es una muestra que se obtiene o deriva de un tejido o fluido biológico correspondiente como la muestra que va a analizarse según los métodos de la divulgación. Esta muestra puede proceder del mismo paciente o personas diferentes y en los mismos momentos de tiempo o diferentes.

Para claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, lo siguiente se refiere al análisis de una muestra de sangre de un paciente. Sin embargo, como apreciará un experto en la materia, los ensayos y técnicas descritos en el presente documento pueden aplicarse a otros tipos de muestras de paciente, que incluyen un líquido corporal (por ejemplo, sangre, médula ósea, plasma, orina, bilis, líquido ascítico), una muestra de tejido que se sospecha que contiene material derivado de un cáncer (por ejemplo, una biopsia) u homogeneizado del mismo. La cantidad de muestra que va a recogerse variará con el tipo de muestra particular y método de determinación de la cantidad de células madre cancerosas usada y será una cantidad suficiente para detectar las células madre cancerosas en la muestra.

Puede obtenerse una muestra de sangre de un paciente que tiene diferentes estadios de desarrollo o de enfermedad. La sangre puede ser extraída de un sujeto de cualquier parte del cuerpo (por ejemplo, un dedo, una mano, una muñeca, un brazo, una pierna, un pie, un tobillo, un estómago y un cuello) usando técnicas conocidas para un experto en la materia, en particular métodos de flebotomía conocidos en la técnica. En una realización específica, se obtiene sangre venosa de un sujeto y se utiliza según los métodos de la invención. En otra realización, se obtiene sangre arterial y se utiliza según los métodos de la invención. La composición de sangre venosa varía según las necesidades metabólicas del área del cuerpo a la que está prestando servicio. A diferencia, la composición de sangre arterial es coherente en todo el cuerpo. Para análisis de sangre rutinarios, se usa generalmente sangre venosa.

La cantidad de sangre recogida variará dependiendo del sitio de recogida, la cantidad requerida para un método de la invención, y la comodidad del sujeto. En algunas realizaciones, se recoge cualquier cantidad de sangre que sea suficiente para detectar la cantidad o cantidad de células madre de cáncer. En una realización específica, se recoge 1 cc o más de sangre de un sujeto.

La cantidad de células madre cancerosas en una muestra puede expresarse como el porcentaje de, por ejemplo, células globales, células cancerosas globales o células madre globales en la muestra, o se cuantifica con respecto al área (por ejemplo, células por campo de potencia alto), o volumen (por ejemplo, células por ml), o arquitectura (por ejemplo, células por espícula de hueso en un espécimen de médula ósea).

En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de sangre, muestra de médula ósea o una muestra de biopsia de tejido/tumor, en la que se cuantifica la cantidad de células madre cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo de unidad en el caso de un análisis histológico). En ciertas realizaciones, la población de células madre de cáncer se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en la sangre o médula ósea o muestra de biopsia de tejido/tumor o como un subconjunto de las células cancerosas presentes en la sangre o médula ósea o muestra de biopsia de tejido/tumor. La población de células madre de cáncer, en otras realizaciones, puede determinarse como una porción (por ejemplo, porcentaje) de las células totales. En aún otras realizaciones, la población de células madre de cáncer se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células madre totales presentes en la muestra de sangre.

En otras realizaciones, la muestra del paciente es una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia de un sujeto con o que se sospecha que tiene tejido canceroso), donde la cantidad de células madre cancerosas puede medirse, por ejemplo, por inmunohistoquímica o citometría de flujo, o basándose en la cantidad de células madre cancerosas por unidad de área, volumen, o peso del tejido. En ciertas realizaciones, la población de células madre de cáncer se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en la muestra de tejido o como un subconjunto de las células cancerosas presentes en la muestra de tejido. En aún otras realizaciones, la población de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células globales o células madre en la muestra de tejido.

La cantidad de células madre cancerosas en una muestra de prueba puede compararse con la cantidad de células madre cancerosas en una muestra(s) de referencia para evaluar la eficacia del régimen. En una realización, la muestra de referencia es una muestra obtenida del sujeto que recibe la terapia en un momento de tiempo anterior (por ejemplo, antes de recibir el régimen como una muestra de referencia del nivel inicial, o en un momento de tiempo anterior mientras que recibe la terapia). En esta realización, la terapia produce deseablemente una disminución en la cantidad de células madre cancerosas en la muestra de prueba en comparación con la muestra de referencia. En otra realización, la muestra de referencia se obtiene de un sujeto sano que no tiene cáncer detectable, o de un paciente que está en remisión para el mismo tipo de cáncer. En esta realización, la terapia produce deseablemente la muestra de prueba que tiene una cantidad igual de células madre de cáncer, o inferior a la cantidad de células madre cancerosas que se detectan en la muestra de referencia.

En otras realizaciones, la población de células madre de cáncer en una muestra de prueba puede compararse con un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad previamente detectada de las células madre cancerosas determinadas para el sujeto para medir la respuesta del sujeto a los regímenes descritos en el presente documento. En una realización específica, una estabilización o reducción en la cantidad de células madre cancerosas con respecto a un intervalo de referencia predeterminado y/o cantidad de células madre de cáncer anterior (previamente detectada) determinada para el sujeto indica una mejora en el pronóstico del sujeto o una respuesta positiva al régimen, mientras que un aumento con respecto al intervalo de referencia predeterminado y/o cantidad de células madre de cáncer anterior indica el mismo pronóstico o peor, y/o un fracaso en responder al régimen. La cantidad de células madre de cáncer puede usarse conjuntamente con otras medidas para evaluar el pronóstico del sujeto y/o la eficacia del régimen. En una realización específica, el intervalo de referencia predeterminado se basa en la cantidad de células madre cancerosas obtenidas de un paciente o población (poblaciones) de pacientes que padece el mismo tipo de cáncer que el paciente que recibe la terapia.

Generalmente, como los antígenos de células madre pueden estar presentes en tanto las células madre cancerosas como las células madre normales, una muestra del paciente afectado con el cáncer tendrá un recuento de células madre más alto que una muestra de un sujeto sano sin cáncer detectable, debido a la presencia de las células madre de cáncer. La terapia producirá deseablemente un recuento de células madre de cáncer para la muestra de prueba (por ejemplo, la muestra del paciente que recibe terapia) que disminuye y llega a ser cada vez más próxima al recuento de células madre en una muestra de referencia que es una muestra de un sujeto sano sin cáncer detectable por un método convencional.

Si se determina que la reducción en la cantidad de células madre cancerosas es inadecuada tras comparar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra del sujeto que recibe el régimen con la muestra de referencia, entonces el profesional médico tiene varias opciones posibles para ajustar el régimen. Por ejemplo, el profesional médico puede entonces aumentar o bien la dosificación o bien la intensidad de la terapia administrada, la frecuencia de la administración, la duración de la administración, combinar la terapia con otra(s) terapia(s), cambiar la gestión por completo, que incluye detener la terapia, o cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la dosificación, frecuencia y/o duración de la administración de una terapia se modifica como resultado del cambio en la cantidad de células madre cancerosas detectadas en o del paciente tratado. Por ejemplo, si un sujeto que recibe terapia para leucemia tiene una medición de células madre de cáncer del 2,5 % de su tumor antes de la terapia y el 5 % después de 6 semanas de terapia, entonces la terapia o régimen pueden alterarse o detenerse debido a que el aumento en el porcentaje de las células madre cancerosas indica que la terapia o régimen no es óptima. Alternativamente, si otro sujeto con leucemia tiene una medición de células madre de cáncer del 2,5 % de su tumor antes de la terapia y el 1 % después de 6 semanas de la terapia, entonces la terapia o régimen puede continuarse debido a que la disminución en el porcentaje de células madre cancerosas indica que la terapia o régimen es eficaz.

La cantidad de células madre cancerosas puede monitorizarse/evaluarse usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. Pueden monitorizarse células madre de cáncer por, por ejemplo, obteniendo una muestra, tal como una muestra de tejido/tumoral, muestra de sangre o una muestra de médula ósea, de un sujeto y detectando las células madre cancerosas en la muestra. La cantidad de células madre cancerosas en una muestra (que puede expresarse como porcentajes de, por ejemplo, células globales o células cancerosas globales) puede evaluarse detectando la expresión de antígenos en células madre de cáncer. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia para medir estas actividades. La expresión de antígenos puede ensayarse, por ejemplo, por inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, transferencias Western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich", ensayos de

5 inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunofluorescencia, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo y análisis FACS. En tales circunstancias, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra de prueba de un sujeto puede determinarse comparando los resultados con la cantidad de células madre en una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de un sujeto que no tiene cáncer detectable) o con un intervalo de referencia predeterminado, o con el propio/la propia paciente en un momento de tiempo anterior (por ejemplo, antes de, o durante la terapia).

10 En una realización específica, la población de células madre de cáncer en una muestra de un paciente se determina por citometría de flujo. Este método explota la expresión diferencial de ciertos marcadores superficiales en las células madre cancerosas con respecto a la masa del tumor. Pueden usarse anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes) para reaccionar con las células en la muestra, y las células se clasifican posteriormente por métodos de FACS. En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de marcadores de superficie celular con el fin de determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Por ejemplo, pueden usarse tanto clasificación de células positivas como negativas para evaluar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Pueden determinarse células madre de cáncer para tipos de tumor específicos evaluando la expresión de marcadores en células madre de cáncer. En ciertas realizaciones, los tumores alojan las células madre cancerosas y sus marcadores asociados como se expone en la Tabla 2 a continuación, que proporciona una lista no limitante de fenotipos de células madre de cáncer asociados a diversos tipos de cáncer.

Tabla 2

Tumor	Fenotipo de células madre de cáncer
Leucemia (LMA)	CD34+/CD38-
Mama	CD44+/CD24-
Cerebro	CD133+
Leucemia (LLA)	CD34+/CD10-/CD19-
Ovario	CD44+/CD24-
Mieloma múltiple	CD138-/CD34-/CD19+
Leucemia mielógena crónica	CD34+/CD38-
Melanoma	CD20+
Ependimoma	CD133+/RC2+
Próstata	CD44+/ $\alpha_2\beta_1^{\text{H}}$ /CD133+

20 Marcadores de células madre de cáncer adicionales incluyen, pero no se limitan a, CD123, CLL-1, combinaciones de SLAM (receptores de la familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización; véase Yilmaz et al., "SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity", *Hematopoiesis* 107: 924-930 (2006)), tales como CD150, CD244 y CD48, y aquellos marcadores desvelados en la patente de EE.UU. N.º 6.004.528 de Bergstein, en la solicitud de patente de EE.UU. en trámite N.º 09/468.286, y en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/0036804. Véase, por ejemplo, la Tabla 1 de la patente de EE.UU. N.º 6.004.528 y las Tablas 1, 2 y 3 de la solicitud de patente de EE.UU. N.º 09/468.286 y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/0036804.

30 En una realización específica, la población de células madre de cáncer en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, tal como una biopsia de tumor sólido, se determina usando técnicas inmunohistoquímicas. Este método explota la expresión diferencial de ciertos marcadores superficiales en las células madre cancerosas con respecto a la masa del tumor. Pueden usarse anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes) para reaccionar con las células en la muestra, y el tejido se tiñe posteriormente. En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de ciertos marcadores de superficie celular con el fin de determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Pueden determinarse células madre de cáncer para tipos de tumor específicos evaluando la expresión de ciertos marcadores que son específicos para células madre de cáncer. En ciertas realizaciones, los tumores alojan las células madre cancerosas y sus marcadores asociados como se expone en la Tabla 2 anterior.

40 Antígenos de células madre de cáncer adecuados pueden identificarse: (i) mediante información públicamente disponible, tal como perfiles de expresión publicados y no publicados que incluyen antígenos de superficie celular de

las células madre cancerosas de un tipo de tumor particular o células madre adultas para un tipo de tejido particular (por ejemplo, Tabla 2), y/o (ii) clonando las células madre cancerosas o células madre adultas de un tumor particular o tipo de tejido, respectivamente, con el fin de determinar sus perfiles de expresión y complemento de antígenos de superficie celular. La clonación de células madre normales es una técnica rutinariamente empleada en la materia (Uchida et al., "Heterogeneity of hematopoietic stem cells", *Curr. Opin. Immunol.* 5:177-184 (1993)). En realidad, esta misma técnica se usa para identificar células madre normales y células madre de cáncer. Además, la suposición de que una proporción de productos génicos de células madre normales, por ejemplo antígenos de superficie celular, también estará presente en las células madre cancerosas derivadas del mismo tipo de tejido ha demostrado ser una forma eficaz de identificación de productos génicos de células madre de cáncer y células madre de cáncer. Por ejemplo, el conocimiento de que la célula madre hematopoyética normal era CD34+/CD38- produjo la determinación de que las células madre de leucemia mieloide aguda (LMA) eran similarmente CD34+/CD38-. Esto de hecho se confirmó por técnicas de clonación de células madre estándar (véase Bonnet et al., "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell", *Nat. Med.* 3:730-737 (1997)). Células madre de cáncer cerebral fueron similarmente aisladas usando un marcador de células madre normal (cerebro), en este caso CD133 (véase Singh et al. "Identification of human brain tumor initiating cells", *Nature* 432(7015):396-401 (2004)).

En ciertas realizaciones usando citometría de flujo de una muestra, puede usarse el protocolo del colorante Hoechst para identificar las células madre cancerosas en tumores. Brevemente, se incuban dos colorantes Hoechst de diferentes colores (normalmente rojo y azul) con células tumorales. Las células madre de cáncer, en comparación con las células cancerosas de la masa, expresan en exceso las bombas de salida de colorante en su superficie que permite que estas células bombeen el colorante de nuevo fuera de la célula. Las células tumorales de la masa tienen en gran parte menos de estas bombas, y son, por tanto, relativamente positivas para el colorante, que puede detectarse por citometría de flujo. Normalmente, emerge un gradiente de células de colorante positivo ("colorante<sup>+</sup>") frente a colorante negativo ("colorante<sup>-</sup>") cuando se observa la población entera de células. Células madre de cáncer están contenidas en la población de colorante<sup>-</sup> o colorante bajo (colorante<sup>bajo</sup>). Para un ejemplo del uso del protocolo de colorante Hoechst para caracterizar una población de células madre, véanse Goodell et al., "A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux pump capacity in acute myeloid leukemia", *Blood*, 98(4):1166-1173 (2001) y Kondo et al., "Persistence of a small population of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:781-786 (2004). De esta forma, podría usarse citometría de flujo para medir la cantidad de células madre de cáncer pre- y post-terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre de cáncer que surge de una terapia o régimen dado.

En otras realizaciones usando citometría de flujo de una muestra, las células en la muestra pueden tratarse con un sustrato para aldehído deshidrogenasa que llega a ser fluorescente cuando es catalizado por esta enzima. Por ejemplo, la muestra puede tratarse con BODIPY® - aminoacetaldehído que está comercialmente disponible de StemCell Technologies Inc. como Aldefluor®. Células madre de cáncer expresan altos niveles de aldehído deshidrogenasa con respecto a las células cancerosas de la masa y, por tanto, llegan a ser brillantemente fluorescentes tras la reacción con el sustrato. Las células madre de cáncer, que llegan a ser fluorescentes en este tipo de experimento, pueden entonces detectarse y contarse usando un citómetro de flujo estándar. De esta forma, podría usarse citometría de flujo para medir la cantidad de células madre de cáncer pre- y post-terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre de cáncer que surge de una terapia o régimen dado.

En otras realizaciones, una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido tumoral o normal, muestra de sangre o muestra de médula ósea) obtenida del paciente se cultiva en sistemas *in vitro* para evaluar la población de células madre de cáncer. Por ejemplo, pueden cultivarse muestras tumorales en agar blando, y la cantidad de células madre cancerosas puede correlacionarse con la capacidad de la muestra para generar colonias de células que pueden ser visualmente contadas. Se considera la formación de colonias una medida sustituta del contenido de células madre, y así, puede usarse para cuantificar la cantidad de células madre de cáncer. Por ejemplo, con cánceres hematológicos, los ensayos formadores de colonias incluyen ensayos de células formadoras de colonias (CFC), ensayos de células de inicio de cultivo a largo plazo (LTC-IC) y ensayos de células de inicio de cultivo en suspensión (SC-IC). De esta forma, el ensayo de formación de colonias o uno relacionado, tal como la perpetuación / paso a largo plazo de una línea celular, podría usarse para medir la cantidad de células madre de cáncer pre- y post-terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre de cáncer que surge de una terapia o régimen dado.

En otras realizaciones, se mide la formación de esferas para determinar la cantidad de células madre cancerosas en una muestra (por ejemplo, las células madre cancerosas forman agrupaciones tridimensionales de células, llamadas esferas) en medios apropiados que son propicios para formar esferas. Las esferas pueden ser cuantificadas para proporcionar una medida de células madre de cáncer. Véase Singh et al., "Identification of a Cancer Stem Cell from Human Brain Tumors", *Cancer Res.* 63: 5821-5828 (2003). También pueden medirse esferas secundarias. Las esferas secundarias se generan cuando las esferas que se forman a partir de la muestra de paciente se separan, y entonces se permite que se vuelvan a formar. De esta forma, el ensayo de formación de esferas podría usarse para medir la cantidad de células madre de cáncer pre- y post-terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre de cáncer que surge de una terapia o régimen dado.

En otras realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra puede determinarse con un ensayo en adoquín. Células madre de cáncer de ciertos cánceres hematológicos forman "áreas de adoquín" (CA) cuando se

añaden a un cultivo que contiene una monocapa de células del estroma de médula ósea. Por ejemplo, la cantidad de células madre cancerosas de una muestra de leucemia puede evaluarse por esta técnica. Las muestras tumorales se añaden a la monocapa de células del estroma de médula ósea. Las células madre de cáncer de leucemia, más que las células de leucemia de la masa, tienen la capacidad de migrar bajo la capa del estroma y sembrar la formación de una colonia de células que puede observarse visualmente bajo microscopía de contraste de fase en aproximadamente 10-14 días como CA. El número de CA en el cultivo es una reflexión del contenido de células madre capaces de injertar la médula ósea de ratones inmunodeficientes. Este ensayo también puede modificarse de manera que las CA puedan ser cuantificadas usando marcas bioquímicas de células en proliferación en lugar de recuento manual, con el fin de aumentar el rendimiento del ensayo. Véase Chung et al., "Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis", *Blood* 105(1):77-84 (2005). De esta forma, el ensayo en aduqín podría usarse para medir la cantidad de células madre de cáncer pre- y post-terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre de cáncer que surge de una terapia o régimen dado.

En otras realizaciones, una muestra (por ejemplo, un tumor o muestra de tejido normal, muestra de sangre o muestra de médula ósea) obtenida del paciente se analiza en sistemas *in vivo* para determinar la población de células madre de cáncer. En ciertas realizaciones, por ejemplo, se usa injerto *in vivo* para cuantificar la cantidad de células madre cancerosas en una muestra. El injerto *in vivo* implica la implantación de un espécimen humano siendo la lectura la formación de tumores en un animal tal como en ratones inmunodeprimidos o inmunodeficientes (tales como ratones NOD/SCID). Normalmente, la muestra del paciente se cultiva o se manipula *in vitro* y entonces se inyecta en los ratones. En estos ensayos, los ratones pueden inyectarse con una cantidad decreciente de células de muestras de paciente, y la frecuencia de formación de tumores puede representarse frente a la cantidad de células inyectadas para determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Alternativamente, la tasa de crecimiento del tumor resultante puede medirse, con tumores más grandes o que avanzan más rápidamente, indicando una cantidad de células madre de cáncer más alta en la muestra de paciente. De esta forma, podría usarse un modelo/ensayo de injerto *in vivo* para medir la cantidad de células madre de cáncer pre- y post-terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre de cáncer que surge de una terapia o régimen dado.

La cantidad de células madre cancerosas en un espécimen puede compararse con un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad anterior de células madre cancerosas previamente determinada para el sujeto (bien antes, o bien durante la terapia) con el fin de medir la respuesta del sujeto a una pata de tratamiento descrita en el presente documento. En una realización específica, una estabilización o reducción en la cantidad de células madre cancerosas con respecto a un intervalo de referencia predeterminado y/o cantidad anterior de células madre de cáncer previamente determinada para el sujeto (bien antes, o bien durante la terapia) indica que la terapia o régimen fue eficaz y así posiblemente una mejora en el pronóstico del sujeto, mientras que un aumento con respecto al intervalo de referencia predeterminado y/o cantidad de células madre de cáncer detectada en un momento de tiempo anterior indica que la terapia o régimen fue ineficaz y así posiblemente la misma o un empeoramiento en el pronóstico del sujeto. La cantidad de células madre de cáncer puede usarse con otras medidas estándar de cáncer para evaluar el pronóstico del sujeto y/o la eficacia de la terapia o régimen: tal como tasa de respuesta, durabilidad de la respuesta, supervivencia sin recaída, supervivencia sin enfermedad, supervivencia sin progresión y supervivencia global. En ciertas realizaciones, la dosificación, frecuencia y/o duración de la administración de una terapia se modifica como resultado de la determinación de la cantidad de células madre cancerosas en diversos momentos de tiempo que pueden incluir antes, durante y/o tras la terapia.

La presente divulgación también se refiere a métodos de determinación de que una terapia del cáncer o régimen es eficaz en el direccionamiento y/o la alteración de las células madre cancerosas en virtud de monitorizar las células madre cancerosas con el tiempo y detectar una estabilización o disminución en la cantidad de células madre cancerosas durante y/o tras el transcurso de la terapia del cáncer o régimen.

En una cierta realización, una terapia o régimen puede describirse o comercializarse como una terapia de células madre contra el cáncer o régimen basado en la determinación de que una terapia o régimen es eficaz en el direccionamiento y/o la alteración de las células madre cancerosas en virtud de haber monitorizado o detectado una estabilización o disminución en la cantidad de células madre cancerosas durante la terapia.

## **5.5 MÉTODOS DE MONITORIZACIÓN DE CÉLULAS CANCEROSAS**

Como parte de los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces de la invención, la cantidad de células cancerosas (sola o en combinación con la cantidad de células madre de cáncer) puede monitorizarse/evaluarse usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. En ciertas realizaciones de los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces de la invención, los regímenes producen una estabilización o reducción en la cantidad (expresada, por ejemplo, como un porcentaje) de células cancerosas en el sujeto. En una realización, el sujeto que recibe el régimen se monitoriza para determinar si el régimen ha producido una estabilización o reducción en la cantidad (expresada, por ejemplo, como un porcentaje) de células cancerosas en el sujeto.

En algunas realizaciones, la cantidad de células cancerosas se evalúa en un sujeto usando técnicas descritas en el presente documento o conocidas para un experto en la materia. En otras realizaciones, la cantidad de células cancerosas se detecta en una muestra. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas y muestras derivadas de una muestra biológica. En ciertas realizaciones, además de la propia muestra biológica o además del material derivado de la muestra biológica tal como células, la muestra usada en los métodos de la presente invención comprende agua añadida, sales, glicerina, glucosa, un agente antimicrobiano, parafina, un agente estabilizante químico, heparina, un anticoagulante, o un agente de tamponamiento. En ciertas realizaciones, la muestra biológica es sangre, suero, orina, médula ósea o líquido intersticial. En otra realización, la muestra es una muestra de tejido. En una realización particular, la muestra de tejido es tejido de mama, colon, pulmón, hígado, ovario, pancreático, próstata, renal, hueso o de piel. En una realización específica, la muestra de tejido es una biopsia, que incluye una biopsia de tumor. La cantidad de muestra biológica tomada del sujeto variará según el tipo de muestra biológica y el método de detección que va a emplearse. En una realización particular, la muestra biológica es sangre, suero u orina y la cantidad de sangre, suero u orina tomada del sujeto es 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml o más. En otra realización, la muestra biológica es un tejido y la cantidad de tejido tomada del sujeto es inferior a 10 miligramos, inferior a 25 miligramos, inferior a 50 miligramos, inferior a 1 gramo, inferior a 5 gramos, inferior a 10 gramos, inferior a 50 gramos, o inferior a 100 gramos.

Según los métodos de la invención, una muestra derivada de una muestra biológica es una en la que la muestra biológica se ha sometida a una o más etapas de pretratamiento antes de la detección y/o medición de la población de células cancerosas en la muestra. En ciertas realizaciones, se pretrata un fluido biológico por centrifugación, filtración, precipitación, diálisis, o cromatografía, o por una combinación de tales etapas de pretratamiento. En otras realizaciones, se pretrata una muestra de tejido por congelación, fijación química, incorporación en parafina, deshidratación, permeabilización u homogenización, seguido de centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o por una combinación de tales etapas de pretratamiento. En ciertas realizaciones, la muestra se pretrata eliminando células distintas de células cancerosas de la muestra, o eliminando residuos de la muestra antes de la determinación de la cantidad de células cancerosas en la muestra según los métodos de la invención.

Las muestras para su uso en los métodos de la presente invención pueden ser tomadas de cualquier sujeto animal, preferentemente mamífero, lo más preferentemente un ser humano. El sujeto del que se obtiene una muestra y se utiliza según los métodos de la presente invención incluye, sin limitación, un sujeto asintomático, un sujeto que manifiesta o que presenta 1, 2, 3, 4, o más síntomas de cáncer, un sujeto clínicamente diagnosticado con que tiene cáncer, un sujeto predispuesto al cáncer, un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, un sujeto que recibe terapia para el cáncer, un sujeto que ha sido médicamente determinado que está libre de cáncer (por ejemplo, tras la terapia para el cáncer), un sujeto que está gestionando el cáncer, o un sujeto que no ha sido diagnosticado con cáncer.

En ciertas realizaciones, la cantidad de células cancerosas se evalúa en un sujeto o una muestra de un sujeto al menos 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, o 30, 60, 90 días 6 meses, 9 meses, 12 meses, o > 12 meses después de que el sujeto empiece a recibir el régimen. En ciertas realizaciones, la cantidad de células cancerosas se evalúa después de varias dosis (por ejemplo, después de 1,2, 5, 10, 20, 30, o más dosis de una terapia). En otras realizaciones, la cantidad de células cancerosas se evalúa después de 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más después de recibir una o más terapias.

La cantidad de células cancerosas en una muestra puede expresarse como el porcentaje de, por ejemplo, células globales en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre o muestra de médula ósea, en la que se cuantifica la cantidad de células cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo de unidad en el caso de un análisis histológico). La población de células cancerosas, en ciertas realizaciones, puede determinarse como un porcentaje de los glóbulos sanguíneos totales.

En otras realizaciones, la muestra del paciente es una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia de un sujeto con o supuesto o que tiene tejido canceroso), donde la cantidad de células cancerosas puede medirse, por ejemplo, por inmunohistoquímica o basándose en la cantidad de células cancerosas por unidad de peso del tejido.

La cantidad de células cancerosas en la muestra de prueba puede compararse con la cantidad de células cancerosas medida en una muestra(s) de referencia para evaluar la eficacia del régimen. En una realización, la muestra de referencia es una muestra del sujeto que recibe la terapia, en un momento de tiempo anterior (por ejemplo, antes de recibir el régimen como una muestra de referencia del nivel inicial, o en un momento de tiempo anterior mientras que recibe la terapia). En esta realización, la terapia produce deseablemente una disminución en la cantidad de células cancerosas en la muestra de prueba en comparación con la muestra de referencia. En otra realización, la muestra de referencia se obtiene de un sujeto sano sin cáncer detectable, o de un paciente que está en remisión para el mismo tipo de cáncer. En esta realización, la terapia produce deseablemente la muestra de prueba que tiene una cantidad igual de células cancerosas como se detecta en la muestra de referencia (por ejemplo, células cancerosas no detectables).

Si se calcula que la reducción en la cantidad de células cancerosas es demasiado pequeña, entonces el profesional médico tiene varias opciones para ajustar el régimen. Por ejemplo, el profesional médico puede entonces o bien aumentar la dosificación de la terapia administrada, la frecuencia de la administración, la duración de la



administración, combinar la terapia con otra(s) terapia(s), detener la terapia, o bien cualquier combinación de los mismos.

La cantidad de células cancerosas puede monitorizarse/evaluarse usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. Las células cancerosas pueden monitorizarse, por ejemplo, obteniendo una muestra, tal como una muestra tumoral, muestra de sangre o muestra de médula ósea, de un sujeto y detectando células cancerosas en la muestra. La cantidad de células cancerosas en una muestra (que puede expresarse como un porcentaje) puede evaluarse detectando la expresión de antígenos en células cancerosas y/o detectando la proliferación de células cancerosas. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia para medir estas actividades. Por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse por ensayos de incorporación de 3H-timidina y recuentos de células con azul de tripano. La expresión de antígenos puede ensayarse, por ejemplo, por inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, transferencias Western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo, análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS) e inmunofluorescencia.

La cantidad de células cancerosas puede compararse con un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad de células cancerosas anterior determinada para el sujeto para medir la respuesta del sujeto a los regímenes descritos en el presente documento. En una realización específica, una reducción en la cantidad de células cancerosas con respecto a un intervalo de referencia predeterminado y/o cantidad de células cancerosas anterior determinada para el sujeto indica una mejora en el pronóstico o respuesta del sujeto a una terapia, mientras que un aumento con respecto al intervalo de referencia predeterminado y/o cantidad de células cancerosas anterior indica el mismo pronóstico o peor, o fallo en responder a una terapia. En ciertas realizaciones, la dosificación, frecuencia y/o duración de la administración de una terapia se modifica como resultado del cambio en la cantidad de células cancerosas.

En algunas realizaciones, la población de células cancerosas puede monitorizarse/evaluarse usando mediciones macroscópicas de la población de células cancerosas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la población de células cancerosas se determina usando métodos de obtención de imágenes tales como tomografía computerizada (CT), imagen por resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, obtención de imágenes de rayos X, mamografía, obtención de imágenes de radionúclido, barridos de PET o gammagrafías óseas.

En realizaciones de la invención que comprenden el tratamiento de tumores sólidos, el tamaño de la masa del tumor puede proporcionar una estimación de la población de células cancerosas. Pueden usarse varios métodos conocidos para evaluar el tamaño en masa del tumor. Ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen métodos de obtención de imágenes (por ejemplo, tomografía computerizada (CT), imagen por resonancia magnética (MRI), barridos de PET, ultrasonidos, obtención de imágenes de rayos X, mamografía, gammagrafías óseas y obtención de imágenes de radioisótopos), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen de mama, examen de ganglios linfáticos, examen abdominal, palpación general), análisis de sangre (por ejemplo, prueba del antígeno específico de la próstata (PSA), prueba del antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba del antígeno del cáncer (CA)-125, alfa-fetoproteína (AFP)), análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de tumores malignos hematológicos), histopatología, citología y citometría de flujo.

En algunas realizaciones, el tamaño de la masa del tumor puede medirse por evaluaciones basadas en el tamaño de las lesiones de tumor determinado a partir de métodos de obtención de imágenes. En realizaciones específicas, las evaluaciones se realizan según las Pautas de los Criterios de evaluación de respuestas en tumores sólidos (RECIST), que se exponen en Therasse, P. et al., "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors", J. of the Nat. Canc. Inst. 92(3), 205-216 (2000). Por ejemplo, en realizaciones específicas, lesiones en el sujeto que son representativas del tamaño en masa del tumor se seleccionan de manera que sean al menos =20 mm en su diámetro más largo en el nivel inicial (antes del tratamiento) cuando se usan técnicas de obtención de imágenes convencionales (por ejemplo, barrido de CT convencional, IRM o rayos X) y lesiones que son al menos =10 mm en su diámetro más largo en el nivel inicial deben seleccionarse cuando se usa barrido de CT en espiral.

## **5.6 MÉTODOS DE MONITORIZACIÓN DEL RECUENTO DE CÉLULAS DE LINFOCITOS, RECUENTO DE CÉLULAS DE NEUTRÓFILOS, RECUENTO DE PLAQUETAS Y HEMOGLOBINA**

Como parte de los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces de la invención, pueden monitorizarse/evaluarse recuentos de linfocitos de sangre periférica usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. Los recuentos de linfocitos de sangre periférica en un sujeto pueden determinarse, por ejemplo, obteniendo una muestra de sangre periférica de dicho sujeto, separando los linfocitos de otros componentes de sangre periférica tales como plasma usando, por ejemplo, centrifugación en gradiente en Ficoll-Hypaque (Pharmacia) y contando los linfocitos usando azul de tripano. Pueden determinarse recuentos de linfocitos T de sangre periférica en un sujeto, por ejemplo, separando los linfocitos de otros componentes de sangre periférica tales como plasma usando, por ejemplo, centrifugación en gradiente en Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Marcar los linfocitos T con un anticuerpo dirigido a un antígeno de linfocitos T tal como CD3, CD4 y CD8 que está conjugado

con un agente detectable por FACS, tal como FITC o ficoeritrina, y medir la cantidad de linfocitos T por FACS. Además, el efecto sobre un subconjunto particular de linfocitos T (por ejemplo, CD2+, CD4+, CD8+, CD45+, CD45RO+, CD45RA+, o CD8+RA+) o linfocitos NK puede determinarse usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia, tales como FACS.

- 5 El recuento de neutrófilos absoluto del sujeto (ANC) puede monitorizarse/evaluarse usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, el régimen incluye monitorizar el ANC del paciente con el fin de evitar el riesgo del paciente de desarrollar neutropenia.

10 El ANC puede calcularse a partir de mediciones del número total de glóbulos blancos (WBC) y los números de neutrófilos y bandas (neutrófilos inmaduros). El ANC puede ser determinado manualmente por tecnólogos médicos formados o por resultados de ANC automatizados obtenidos de analizadores de hematología automatizados.

El recuento de plaquetas del sujeto (PLT) puede monitorizarse/evaluarse usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, el régimen incluye monitorizar el recuento de plaquetas del paciente con el fin de evitar el riesgo del paciente de desarrollar trombocitopenia o llegar a ser dependiente de transfusiones de sangre. Las transfusiones pueden ser dadas como se ha determinado por el médico.

- 15 La hemoglobina del sujeto (Hgb) puede monitorizarse/evaluarse usando técnicas convencionales conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, el régimen incluye monitorizar la hemoglobina del paciente con el fin de evitar el riesgo del paciente de desarrollar anemia o llegar a ser dependiente de transfusiones. Las transfusiones o factores de crecimiento (por ejemplo, eritropoyetina) puede ser dadas como se ha determinado por el médico.

## 5.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 20 5.7.1 ENSAYOS *IN VITRO*

Los compuestos, composiciones farmacéuticas y regímenes de la invención pueden probarse *in vitro* y/o *in vivo* para su capacidad para reducir la cantidad de células cancerosas y/o células madre de cáncer, o inhibir su proliferación. La capacidad de un compuesto o un régimen de la invención para reducir la cantidad de células cancerosas, las células madre cancerosas y/o células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos) o inhibir su proliferación puede evaluarse:  
 25 detectando la expresión de antígenos en células cancerosas, células madre de cáncer y/o células inmunitarias; detectando la proliferación o viabilidad de células cancerosas, células madre cancerosas y células inmunitarias; detectando la función efectora de células cancerosas y células madre de cáncer. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia para medir estas actividades. Por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse por ensayos de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina y recuentos de células con azul de tripano. La expresión de  
 30 antígenos puede ensayarse, por ejemplo, por inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias Western, inmunohistoquímica radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos,  
 35 inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y análisis FACS.

Un compuesto, composición farmacéutica o régimen de la invención se prueba preferentemente *in vitro* y luego *in vivo* para la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de uso en seres humanos. Por ejemplo, ensayos que pueden usarse para determinar si la administración de un compuesto específico se indica incluyen ensayos de cultivo celular en los que una muestra de tejido del paciente (por ejemplo, una célula cancerosa o célula madre de  
 40 cáncer) se cultiva en cultivo y se expone a, o se pone de otro modo en contacto con, un compuesto de la invención, y se observa el efecto de tal compuesto sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido puede obtenerse por biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la terapia terapéuticamente más eficaz (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) para cada paciente individual.

Determinación de la viabilidad celular usando el ensayo de XTT: En algunos casos, se aíslan células CD34+ de sangre del cordón humano usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD34. Entonces se cuentan las células aisladas y se separan en alícuotas en placas de 96 pocillos y luego se incuban en presencia de concentraciones variables de cantaridina o norcantaridina. La viabilidad celular se mide mediante la adición del reactivo colorimétrico XTT. La viabilidad se determina por la absorbancia de cultivos tratados a aproximadamente  
 45 450-500 nm en comparación con cultivos no tratados. En otros casos, las células usadas en el ensayo pueden ser una línea celular de leucemia, tal como MV4;11. El ensayo también puede usarse para determinar el transcurso de tiempo de destrucción de células por diversos compuestos realizando el ensayo de XTT en cultivos que se incuban con los compuestos durante periodos de tiempo variables.

Ensayo en adoquín: El ensayo de células formadoras de área en adoquín (CAFC) explota un punto final visual reproducible para la cuantificación de células madre de cáncer. Se añaden muestras de leucemia a cultivos adherentes de células del estroma, en algunas realizaciones, células del estroma MS-5. Las células madre cancerosas en el cultivo migrarán debajo de las células del estroma MS-5 y formarán una colonia de células llamada un adoquín que puede ser visualmente cuantificada. Para probar el efecto de la cantaridina o norcantaridina sobre la población de células madre de cáncer usando este ensayo, las células se cultivan primero en presencia del fármaco.  
 55

En algunas realizaciones, las células se cultivan durante 16 horas. Después de esta incubación, las células se añaden a los cultivos de estroma. Una reducción en la formación de área en adoquín en los cultivos que se trataron con el fármaco en comparación con las células sin tratar representa la actividad de las células madre de cáncer para el fármaco.

## 5 5.7.2 ENSAYOS *IN VIVO*

Los compuestos, composiciones farmacéuticas y regímenes de la invención pueden probarse en sistemas de modelo animal adecuados antes del uso en seres humanos. Tales sistemas de modelo animal incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollo, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc., puede usarse cualquier sistema animal muy conocido en la técnica. Pueden variar varios aspectos del procedimiento; dichos aspectos incluyen, pero no se limitan a, el régimen temporal de administrar las modalidades terapéuticas (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos), si tales modalidades terapéuticas se administran por separado o como una mezcla, y la frecuencia de administración de las modalidades terapéuticas.

Pueden usarse modelos animales para el cáncer para evaluar la eficacia de un compuesto o una terapia de combinación de la invención. Ejemplos de modelos animales para el cáncer de pulmón incluyen, pero no se limitan a, modelos animales de cáncer de pulmón descritos por Zhang & Roth (1994, *In Vivo* 8(5):755-69) y un modelo de ratón transgénico con función p53 alterada (véase, por ejemplo, Morris et al. *J. La. State Med. Soc.* 1998, 150(4):179-85). Un ejemplo de un modelo animal para cáncer de mama incluye, pero no se limita a, un ratón transgénico que expresa en exceso ciclina D1 (véase, por ejemplo, Hosokawa et al., *Transgenic Res.* 2001, 10(5), 471-8). Un ejemplo de un modelo animal para cáncer de colon incluye, pero no se limita a, un ratón con inactivación doble de TCR b y p53 (véase, por ejemplo, Kado et al., *Cancer Res.* 2001, 61(6):2395-8). Ejemplos de modelos animales para cáncer pancreático incluyen, pero no se limitan a, un modelo metastásico de adenocarcinoma pancreático murino PancO2 (véase, por ejemplo, Wang et al., *Int. J. Pancreatol.* 2001, 29(1):37-46) y ratones nu-nu generados en tumores pancreáticos subcutáneos (véase, por ejemplo, Ghaneh et al., *Gene Ther.* 2001, 8(3):199-208). Ejemplos de modelos animales para linfoma no Hodgkin incluyen, pero no se limitan a, un ratón con inmunodeficiencia combinada grave ("SCID") (véase, por ejemplo, Bryant et al., *Lab Invest.* 2000, 80(4), 553-73) y un ratón transgénico IgHmu-HOX11 (véase, por ejemplo, Hough et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95(23), 13853-8). Un ejemplo de un modelo animal para cáncer de esófago incluye, pero no se limita a, un ratón transgénico para el oncogén E7 tipo 16 del virus del papiloma humano (véase, por ejemplo, Herber et al., *J. Virol.* 1996, 70(3):1873-81). Ejemplos de modelos animales para carcinomas colorrectales incluyen, pero no se limitan a, modelos de ratón Apc (véase, por ejemplo, Fodde & Smits, *Trends Mol. Med.* 2001, 7(8):369-73 y Kuraguchi et al., *Oncogene* 2000, 19(50), 5755-63).

En ciertas técnicas *in vivo*, se usa un agente de obtención de imágenes, o resto de diagnóstico, que se une a moléculas en células cancerosas o células madre de cáncer, por ejemplo, célula cancerosa o célula madre de antígenos de superficie del cáncer. Por ejemplo, una marca fluorescente, radionúclido, metal pesado o emisor de fotones se une a un anticuerpo (incluyendo un fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno de superficie de células madre de cáncer. Antígenos de superficie de células madre de cáncer a modo de ejemplo se enumeran anteriormente en la Tabla 2. El profesional médico puede infundir el anticuerpo marcado en el paciente bien antes de, durante, o tras el tratamiento, y entonces el médico puede poner al paciente en un escáner de cuerpo entero/desarrollador que puede detectar la marca unida (por ejemplo, marca fluorescente, radionúclido, metal pesado, emisor de fotones). El escáner/desarrollador (por ejemplo, CT, IMR, u otro escáner, por ejemplo detector de marca fluorescente, que pueda detectar la marca) registra la presencia, suma/cantidad y localización corporal del anticuerpo unido. De este modo, el mapeo y la cuantificación de marca (por ejemplo, fluorescencia, radiactividad, etc.) en patrones (es decir, diferente de los patrones de células madre normales dentro de un tejido) dentro de un tejido o tejidos indica la eficacia de tratamiento dentro del cuerpo del paciente cuando se compara con un control de referencia tal como el mismo paciente en un momento de tiempo anterior o un paciente que no tiene cáncer detectable. Por ejemplo, una señal grande (con respecto a un intervalo de referencia o una fecha de tratamiento previa, o antes del tratamiento) en una localización particular indica la presencia de células madre de cáncer. Si esta señal aumenta con respecto a una fecha anterior, sugiere un empeoramiento de la enfermedad y fracaso de la terapia o régimen. Alternativamente, una disminución en la señal indica que la terapia o régimen ha sido eficaz.

Similarmente, en algunas realizaciones de la invención, la eficacia del régimen terapéutico en reducir la cantidad de células cancerosas en animales (incluyendo seres humanos) que reciben tratamiento puede evaluarse usando técnicas *in vivo*. En una realización, el profesional médico realiza la técnica de obtención de imágenes con molécula marcada que se une específicamente a la superficie de una célula cancerosa, por ejemplo, un antígeno de superficie de célula cancerosa. Véase la Sección 5.4, arriba, enumera ciertos antígenos de superficie de células cancerosas. De este modo, el mapeo y la cuantificación de la marca (por ejemplo, fluorescencia, radiactividad) en patrones dentro de un tejido o tejidos indican la eficacia del tratamiento dentro del cuerpo del paciente que recibe el tratamiento.

En una realización específica, la cantidad de células madre cancerosas se detecta *in vivo* en un sujeto según un método que comprende las etapas de: (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente de unión de marcador de célula madre de cáncer marcada que se une específicamente a un marcador de superficie de célula encontrado en las células madre de cáncer, y (b) detectar el agente marcado en el sujeto tras un intervalo de tiempo

suficiente para permitir que el agente marcado se concentre en sitios en el sujeto donde se expresa el marcador de superficie de célula madre de cáncer. Según esta realización, el agente de unión de marcador de superficie de célula madre de cáncer se administra al sujeto según cualquier método adecuado en la materia, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), o por vía intraperitoneal. Según esta realización, la cantidad eficaz del agente es la cantidad que permite la detección del agente en el sujeto. Esta cantidad variará según el sujeto particular, la marca usada y el método de detección empleado. Por ejemplo, se entiende en la materia que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes usado determinarán la cantidad de agente marcado necesario para detectar el agente en un sujeto usando obtención de imágenes. En el caso de un agente radiomarcado para un sujeto humano, la cantidad de agente marcado administrado se mide en términos de radiactividad, por ejemplo de aproximadamente 5 a 20 milicurios de  $^{99}\text{Tc}$ . El intervalo de tiempo tras la administración del agente marcado que es suficiente para permitir que el agente marcado se concentre en los sitios en el sujeto donde el marcador de superficie de células madre de cáncer se expresa variará dependiendo de varios factores, por ejemplo, el tipo de marca usada, el modo de administración y la parte del cuerpo del sujeto de la que se obtienen imágenes. En una realización particular, el intervalo de tiempo que es suficiente es 6 a 48 horas, 6 a 24 horas, o 6 a 12 horas. En otra realización, el intervalo de tiempo es 5 a 20 días o 5 a 10 días. La presencia del agente de unión de marcador de superficie de células madre de cáncer marcadas puede detectarse en el sujeto usando medios de obtención de imágenes conocidos en la técnica. En general, los medios de obtención de imágenes empleados dependen del tipo de marca usada. Expertos en la materia serán capaces de determinar los medios apropiados para detectar una marca particular. Métodos y dispositivos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, tomografía computerizada (CT), barrido de cuerpo entero tal como tomografía de emisión de positrones (PET), imagen por resonancia magnética (IRM), fluorescencia, quimioluminiscencia, un generador de imágenes que puede detectar y localizar marca fluorescente y sonografía. En una realización específica, el agente de unión de marcador de superficie de células madre de cáncer se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston et al., patente de EE.UU. N.º 5.441.050). En otra realización, el agente de unión de marcador de superficie de células madre de cáncer se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de barrido sensible a la fluorescencia. En otra realización, el agente de unión de marcador de superficie de células madre de cáncer se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, el agente de unión de marcador de superficie de células madre de cáncer se marca con una marca paramagnética y se detecta en un paciente usando imagen por resonancia magnética (IRM).

Cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* (*ex vivo*) conocido para aquellos expertos en la materia que pueda detectar y/o cuantificar las células madre cancerosas puede usarse para monitorizar las células madre cancerosas con el fin de evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de una terapia del cáncer o régimen desvelado en el presente documento para el cáncer o uno o más síntomas del mismo; o estos ensayos pueden usarse para evaluar el pronóstico de un paciente. Los resultados de estos ensayos pueden entonces usarse para posiblemente mantener o alterar la terapia del cáncer o régimen.

### 5.7.3 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD

La toxicidad y/o eficacia de los compuestos, composiciones farmacéuticas y regímenes de la invención pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50 % de la población) y la  $DE_{50}$  (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación  $DL_{50}/DE_{50}$ . Se prefieren regímenes terapéuticos que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse regímenes terapéuticos que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no infectadas y así reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación de las terapias para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la  $DE_{50}$  con poca o ninguna toxicidad a tejidos normales. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia usada en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la  $CI_{50}$  (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición al 50 % de síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse niveles de compuestos en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

### 5.8 ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

La presente divulgación también engloba un envase acabado y producto farmacéutico etiquetado. Este artículo de fabricación incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un recipiente o contenedor apropiado tal como un vial de vidrio u otro recipiente que esté herméticamente cerrado. El producto farmacéutico puede contener, por

ejemplo, un conjugado de la invención en una forma de dosificación unitaria en un primer recipiente, y en un segundo recipiente, agua estéril para inyección. Alternativamente, la forma de dosificación unitaria puede ser un sólido adecuado para administración oral, transdérmica, intranasal o tópica.

5 En una realización específica, la forma de dosificación unitaria es adecuada para administración parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, oral, intraperitoneal, tópica o subcutánea. Así, la divulgación engloba disoluciones, preferentemente estériles, adecuadas para cada vía de administración.

10 Como con cualquier producto farmacéutico, el material de envase y el recipiente están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y transporte. Además, los productos de la invención incluyen instrucciones para su uso u otro material de información que avisa al médico, técnico o paciente sobre cómo prevenir apropiadamente o tratar la enfermedad o trastorno en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o que sugieren un régimen de dosificación que incluye, pero no se limita a, dosis real, procedimientos de monitorización, recuentos de células cancerosas, recuentos de células madre de cáncer, y otra información de monitorización.

15 Específicamente, la divulgación proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envase, tal como una caja, botella, tubo, vial, recipiente, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), sobre y similares; y al menos una forma de dosificación unitaria de un agente farmacéutico contenida dentro de dicho material de envase, en el que dicho agente farmacéutico comprende un compuesto de la invención, y en el que dicho material de envase incluye medios de instrucción que indican que dicho compuesto puede usarse para prevenir, gestionar, tratar y/o mejorar uno o más síntomas asociados al cáncer, o uno o más síntomas del mismo administrando dosis específicas y usando regímenes de dosificación específicos como se describe en el presente documento.

20 En una realización preferida, el artículo de fabricación incluye anticuerpos marcados que se unen a células cancerosas, y preferentemente, que se unen a células madre de cáncer. Como tal, el artículo contiene un método para monitorizar la eficacia del régimen terapéutico, y para ajustar, si hubiera necesidad, las dosificaciones y/o regímenes terapéuticos.

25 La presente divulgación también proporciona un pack o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de reactivos para detectar, monitorizar y/o medir células madre de cáncer. En una realización, el pack o kit farmacéutico comprende opcionalmente instrucciones para el uso de los reactivos proporcionados para detectar y/o medir células madre de cáncer. En otra realización, el pack o kit farmacéutico opcionalmente comprende un aviso en forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, aviso que refleja la autorización por la agencia de la fabricación, para su uso o venta para administración humana.

30 En una realización, el envase o kit farmacéutico comprende en uno o más recipientes un agente de unión de marcador de superficie de células madre de cáncer. En una realización particular, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente o específicamente a un marcador de superficie de células madre de cáncer. En una realización particular, el agente es un anticuerpo (que incluye, por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)<sub>2</sub> o fragmentos de unión al epítipo), que reacciona de forma cruzada con cualquier marcador de superficie de células madre de cáncer. En otra realización, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con uno cualquiera de los marcadores de superficie de células madre de cáncer enumerados en la Tabla 2. En otra realización, el anticuerpo reacciona con uno cualquiera de los marcadores de superficie de células madre de cáncer enumerados en la Tabla 1 de la patente de EE.UU. N.º 6.004.528 o Tablas 1, 2, o 3 de la solicitud de patente de EE.UU. N.º 09/468.286, y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/0036804. Según esta realización, el pack o kit farmacéutico comprende uno o más anticuerpos que se unen a marcadores de superficie de células madre de cáncer, en el que cada anticuerpo se une a un epítipo diferente del marcador de superficie de células madre de cáncer y/o se une al marcador de superficie de células madre de cáncer con una afinidad diferente.

35 Para los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (que puede o puede no unirse a un soporte sólido) que se une a una proteína de marcador de superficie de células madre de cáncer; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une a o bien la proteína de marcador de superficie de células madre de cáncer unida por el primer anticuerpo, o bien el primer anticuerpo y se conjuga con una marca detectable (por ejemplo, una marca fluorescente, isótopo radiactivo o enzima). Los kits basados en anticuerpo también pueden comprender perlas para realizar una inmunoprecipitación. Cada componente de los kits basados en anticuerpo está generalmente en su propio recipiente adecuado. Así, estos kits generalmente comprenden recipientes distintos adecuados para cada anticuerpo. Además, los kits basados en anticuerpo pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes del rendimiento del ensayo. Como un ejemplo, un kit puede incluir un anticuerpo anti-CD34 para selección positiva, un anticuerpo anti-CD38 para selección negativa y un anticuerpo anti-CD123 para selección positiva para aislar y/o cuantificar y/o ayudar en la determinación de la cantidad de células madre cancerosas de leucemia (que son CD34+/CD38-/CD123+).

Para kits de micromatrices de ácido nucleico, los kits generalmente comprenden (pero no se limitan a) sondas específicas para ciertos genes unidas a una superficie de soporte sólido. En otras realizaciones, las sondas son solubles. En una realización tal, las sondas pueden ser o bien oligonucleótidos o bien sondas de longitud más larga que incluyen sondas que oscilan de 150 nucleótidos de longitud a 800 nucleótidos de longitud. Las sondas pueden marcarse con una marca detectable. Los kits de micromatriz pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes del rendimiento del ensayo. Los kits también pueden comprender reactivos de hibridación y/o reactivos necesarios para detectar una señal producida cuando una sonda se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos de marcador de superficie de células madre de cáncer. Generalmente, los materiales y reactivos para los kits de micromatriz están en uno o más recipientes. Cada componente del kit está generalmente en su propio recipiente adecuado.

Para PCR cuantitativa, los kits generalmente comprenden cebadores pre-seleccionados específicos para ciertas secuencias de ácidos nucleicos de marcador de superficie de células madre de cáncer. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender enzimas adecuadas para amplificar ácidos nucleicos (por ejemplo, polimerasas tales como Taq), y desoxinucleótidos y tampones necesarios para la mezcla de reacción para amplificación. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender sondas específicas para las secuencias de ácidos nucleicos asociadas a o indicativas de una afección. Las sondas pueden o pueden no marcarse con un fluoróforo. Las sondas pueden o pueden no marcarse con una molécula extintora. En algunas realizaciones, los kits de PCR cuantitativa también comprenden componentes adecuados para ARN de transcripción inversa que incluyen enzimas (por ejemplo, transcriptasa inversas tales como AMV, MMLV y similares) y cebadores para la transcripción inversa junto con desoxinucleótidos y tampones necesarios para la reacción de transcripción inversa. Cada componente del kit de PCR cuantitativa está generalmente en su propio recipiente adecuado. Así, estos kits generalmente comprenden distintos recipientes adecuados para cada reactivo individual, enzima, cebador y sonda. Además, los kits de PCR cuantitativa pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes del rendimiento del ensayo.

Un kit puede opcionalmente comprender además una cantidad predeterminada de un polipéptido o un ácido nucleico de marcador de superficie de células madre de cáncer aislado que codifica un marcador de superficie de células madre de cáncer, por ejemplo, para su uso como un patrón o control. Los métodos de diagnóstico de la presente invención pueden ayudar a realizar o monitorizar un estudio clínico. Según la presente invención, pueden usarse muestras de prueba adecuadas, por ejemplo, de suero o tejido, obtenidas de un sujeto para el diagnóstico.

Basándose en los resultados obtenidos por el uso del pack o kit farmacéutico (es decir, si la cantidad de células madre de cáncer se ha estabilizado o disminuido), el profesional médico que administra la terapia del cáncer o régimen puede elegir continuar con la terapia o régimen. Alternativamente, basándose en el resultado de que la cantidad de células madre de cáncer haya aumentado, el profesional médico puede elegir continuar, alterar o detener la terapia o régimen.

## 6. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, y no deben visualizarse como limitantes del alcance de la presente invención. Variaciones lógicas, tales como aquellas que se le ocurren a un artesano razonable, pueden hacerse en el presente documento sin apartarse del alcance de la presente invención.

### 6.1 EJEMPLO 1

#### 6.1.1 PACIENTES Y DISEÑO DEL ESTUDIO

El siguiente ejemplo describe los resultados de un estudio clínico en el que un conjugado de toxina diftérica-interleucina-3 se administró a pacientes que padecían leucemia mieloide aguda (LMA).

Los pacientes fueron diagnosticados con LMA basándose en biopsia de médula ósea y cualquiera de recaída de enfermedad o LMA de riesgo elevado (síndrome mielodisplásico (SMD) previo, relacionado con el tratamiento, edad de los pacientes >70 años, o citogenética no favorable y no candidato para trasplante alógeno). Los pacientes tenían que tener un estado general <2, WBC <10.000/ml, bilirrubina <1,5 mg/dl, transaminasas <2,5x límite superior normal, albúmina >3 g/dl, creatinina <1,5 mg/dl, reserva cardíaca adecuada (EF>40%), concentración en suero pretratamiento anti-DT <2,4 µg/ml, estar dispuesto a dar consentimiento informado y tratarse en un sitio autorizado, estar dispuesto a usar una forma autorizada de control de la natalidad mientras que está en el estudio, no tener problemas médicos graves simultáneos o infecciones no controladas o DIC o embarazo, no tener leucemia del SNC activa, no haber tenido un infarto de miocardio en el plazo de los últimos seis meses, no requerir oxígeno, y no tener un alergia a la toxina diftérica.

Los pacientes fueron ingresados en el hospital, se le dio alopurinol, solución salina normal, moxifloxacino, fluconazol, vitamina K, acetaminofeno, difenhidramina e hidrocortisona y la dosis de aumento inter-individual de DT388IL-3 IV durante 15 minutos en M-X-V durante dos semanas. Se trataron cohortes de al menos 3 pacientes a cada nivel de dosis. Los pacientes se monitorizaron para toxicidades usando NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 3.0. Las constantes vitales se midieron frecuentemente en los días de tratamiento. Se registró diariamente la entrada/salida cuidadosa. Se probaron diariamente CBC, CMP, panel de coagulación, LDH,

ácido úrico y magnesio. Se extrajo sangre para estudios de farmacología clínica que incluyen farmacocinética y respuesta inmunitaria. Se repitieron biopsias de la médula ósea en el día 15, 30, 60, y cada tres meses hasta la recaída. Las respuestas se midieron basándose en las recomendaciones revisadas del grupo de trabajo internacional.

## 5 6.1.2 RESULTADOS

Se han cribado cuarenta y nueve pacientes con LMA y veintisiete pacientes tratados (Tabla 3). La mediana de la edad de los pacientes tratados fue 59 años (intervalo, 25-81 años). Hubo trece hombres y catorce mujeres. La enfermedad era *de novo* en dos, primera recaída en diez, segunda recaída en siete, y resistente en ocho pacientes. Tres pacientes tenían una historia de SMD, y uno tuvo una historia de LMA secundaria. Un paciente había recibido previamente un trasplante autólogo o alógeno de células madre cada uno. Las citogenéticas fueron desfavorables en diez, intermedia en dieciséis, y no se hizo en uno. Siete pacientes se trataron con 4 µg/kg, ocho pacientes se trataron con 5,3 µg/kg, once pacientes se trataron con 7,1 µg/kg y un paciente se trató con 9 µg/kg de DT<sub>388</sub>IL-3 (Tabla 4). Las toxicidades relacionadas con los fármacos fueron de leves a moderadas y transitorias, que incluyen fiebre, escalofríos, hipotensión, hipoxemia e hipoalbuminemia. De entre veintisiete pacientes evaluables, los presentes inventores han observado una CR en curso de 6+ meses de duración, dos remisiones parciales (PR) que duran uno y dos+ meses y tres respuestas mínimas con eliminación de blastos periféricos y citorreducciones de blastos de médula ósea del 89 %, 90 % y 93 % que duran de uno a dos meses (Tabla 5 y Figura 4).

Toxicidades hasta la fecha en el estudio clínico han sido de leves a moderadas. Se produjeron fiebres, pero respondieron a acetaminofeno y métodos de enfriamiento. La hipotensión y uremia transitoria respondieron a hidratación. La hipoxemia e hipoalbuminemia se invirtieron con infusiones de albúmina y diuresis. No se ha observado disfunción hepática significativa. Después del estudio clínico de DT<sub>388</sub> GMCSF, los presentes inventores establecieron un modelo preclínico para la toxicidad del hígado usando moléculas de fusión de DT con GMCSF murino e IL-3, DT<sub>388</sub>mGMCSF y DT<sub>388</sub>mIL-3, respectivamente. 27 Ratas tratadas con DT<sub>388</sub>mGMCSF, pero no DT<sub>388</sub>mIL-3, mostraron lesión de células de Kupffer, hinchazón de hepatocitos y transaminasemia. La falta de receptor de IL-3 en células de Kupffer parece proteger del daño del hígado. Estudios en mono y clínicos hasta la fecha confirman ese hallazgo.

Los resultados anteriores muestran claramente que el conjugado de toxina diftérica-interleucina-3 era selectivamente citotóxico para células leucémicas con respecto a células hematopoyéticas normales y produjo remisiones clínicas en pacientes humanos.

30 Tabla 3. Resultados de toxicidades de pacientes tratados con DT<sub>388</sub>IL3, respuesta inmunitaria y respuesta clínica\*

Paciente N.º	Nivel de dosis (µg/kg)	Toxicidades		Anticuerpo anti-DT (µg/ml)		
		Gr2 CTCV3	d1	d15	d30	
1	4	N-V, Trans	0,8	23	235	
2	4	0	2,5	ND	ND	
3	4	F, N-V, Alb, Hipo	0	ND	36	
4	4	F, Alb	0	ND	ND	
5	4	F, Alb	0	ND	48	
6	4	Hipo	0,9	ND	36	
7	4	Alb	2,2	1	6,2	
8	5,32	Alb	1	221	263	
9	5,32	Alb, Trans	0,8	440	ND	
10	5,32	Alb	0,5	ND	1,1	
11	5,32	F, Alb, Trans	2,5	ND	ND	
12	5,32	Hipo, F, Alb	1,3	600	ND	
13	5,32	Alb	1,5	ND	ND	
14	5,32	Alb, Trans	0,3	0,3	ND	
15	5,32	Alb, Trans	0	1,6	29	

ES 2 646 545 T3

Paciente N.º	Nivel de dosis (µg/kg)	Toxicidades Gr2 CTCV3	Anticuerpo anti-DT (µg/ml)		
			d1	d15	d30
16	7,07	Alb, Trans	1	0	ND
17	7,07	Alb	1,2	ND	ND
18	7,07	F, Alb, Disn	0,7	0,4	ND
19	7,07	VLS, Alb, Disn	0,8	8,3	22,4
20	7,07	Alb, Trans	0,4	ND	ND
21	7,07	Alb, Trans	2,1	1,5	4,2
22	7,07	Alb, Trans	1,7	1,2	ND
23	7,07	F, Alb, VLS	2,2	32	104
24	7,07	0	4,3	ND	4
25	7,07	Alb	3,8	ND	ND
26	7,07	F, Alb, Trans	0,5	ND	ND
27	9,4	F, Alb, Trans	3	ND	ND
28	9,4	F, Alb	1,3	300	ND
29	7,07	F, Alb	1,5	ND	ND
30	9,4	Alb	3	0,8	ND
31	9,4	F, Trans	2,3	ND	ND
32	9,4	Alb, Trans	2,2	3,1	ND
33	9,4	Alb, Trans	1,2	ND	ND
34	9,4	Alb, Trans	2,2	ND	306
35	9,4	Alb	0,8	252	ND
36	12,5	Alb, Trans	1,3	11,2	16,8

\* F = Fiebre, N-V = náuseas y vómitos, Trans = transaminasemia, VLS = síndrome de fuga vascular, Alb=hipoalbuminemia, Hipo = hipotensión, Disn = disnea, ND = no determinado, MR = respuesta mínima, PR = respuesta parcial, CR = respuesta completa.

Paciente N.º	Dosis µg/kg/ día	Gr 2 relacionado con el fármaco o efectos secundarios más altos (grado de toxicidad de CTC)
1	4	Gr 2 náuseas; Gr 2 vómitos; Gr 2 ALT
2	4	Ninguno
3	4	Gr 2 hipotensión; Gr 2 taquicardia sinusal; Gr 2 fiebre; Gr 2 aumento de peso; Gr 2 náuseas; Gr 2 vómitos; Gr 2 hipoalbuminemia;
4	4	Gr 2 fiebre; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia
5	4	Gr 2 fiebre; Gr 2 escalofríos moderados / escalofríos intensos; Gr 2 CPK; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia



ES 2 646 545 T3

Tabla 4 Nivel de dosis y efectos tóxicos relacionados con los fármacos de pacientes con LMA tratados con DT <sub>388</sub> IL3		
Paciente N.º	Dosis µg/kg/ día	Gr 2 relacionado con el fármaco o efectos secundarios más altos (grado de toxicidad de CTC)
6	4	Gr 2 hipotensión; Gr 2 hipocalcemia
7	4	Gr 2 hipoalbuminemia
8	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia
9	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 AST; Gr 2 ALT
10	5,32	Gr 2 taquicardia supraventricular; Gr 2 hipoalbuminemia
11	5,32	Gr 2 fiebre; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 AST; Gr 2 ALT
12	5,32	Gr 2 hipotensión; Gr 2 fiebre; Gr 2 escalofríos moderados / escalofríos intensos; Gr 2 aumento de peso; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia
13	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia
14	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 ALT
15	5,32	Gr 2 fatiga; Gr 2 escalofríos moderados / escalofríos intensos; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 ALT
16	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 ALT
17	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia
18	7,07	Gr 2 hipertensión; Gr 2 fatiga; Gr 2 fiebre; Gr 2 urticaria/descamación; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 debilidad muscular, cuerpo entero/generalizado; Gr 2 Disnea
19	7,07	Gr 2 síndrome de fuga vascular agudo; Gr 2 hipertensión; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 disnea; Gr 2 hipoxia
20	7,07	Gr 2 hiperbilirrubinemia; Gr 2 hiperglucemia; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 AST; Gr 2 ALT
21	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia, Gr 2 AST, Gr 2 ALT
22	7,07	Ninguno
23	7,07	Gr 2 fiebre; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 síndrome de fuga vascular agudo
24	7,07	Ninguno
25	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia
26	7,07	Gr 2 AST
27	9	Gr 2 fiebre; Gr 2 ALT; Gr 2 hipoalbuminemia

Paciente N.º	% de blastos pre-tratamiento	Respuesta global	Longitud de respuesta (meses)
9	50 %	PR	1
13	69 %	MR con 93 % de reducción*	2
14	90 %	MR con 89 % de reducción*	1
15	80 %	MR con 90 % de reducción*	1
19	30 %	CR	en curso durante >6
23	39 %	PR	en curso durante >2

\*Citorreducción calculada a partir del cambio en el índice de blastos de la médula ósea = % de blastos x % de celularidad.

## 6.2 EJEMPLO 2

### 6.2.1 PACIENTES Y MÉTODOS

- 5 Los pacientes tenían que tener LMA basada en biopsia de médula ósea y o bien enfermedad, recaída de enfermedad, enfermedad resistente o LMA de riesgo alto (SMD previo, relacionado con el tratamiento, edad de los pacientes >70 años, o citogenética no favorable y no candidato para trasplante alógeno). Los pacientes tenían que tener un estado general <2, WBC <10.000/ml, bilirrubina <1,5 mg/dl, transaminasas <2,5x límite superior de lo normal, albúmina >3 g/dl, creatinina <1,5 mg/dl, reserva cardíaca adecuada (EF>40 %), concentración en suero pretratamiento anti-DT <2,4 µg/ml, estar dispuesto a dar consentimiento informado y tratarse en un sitio autorizado, estar dispuesto a usar una forma autorizada de control de la natalidad mientras que está en el estudio, no tener problemas médicos graves simultáneos o infecciones no controladas o DIC o embarazo, no tener leucemia del SNC activa, no haber tenido un infarto de miocardio en el plazo de los últimos seis meses, no requerir oxígeno, y no tener una alergia a DT.
- 10
- 15 Los pacientes recibieron infusiones de 15 minutos de DT<sub>388</sub>L-3 tres veces a la semana durante dos semanas con aumento de dosis inter-individual a dosis de 4-12,5 µg/kg/dosis.

### 6.2.2 RESULTADOS - CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

- 20 Sesenta y cinco pacientes con LMA han sido cribados hasta la fecha y treinta y seis pacientes tratados (Tabla 6). La mediana de la edad de los pacientes tratados era 60 años (intervalo, 25-81 años). Hubo veinte hombres y dieciséis mujeres. La enfermedad era LMA *de novo* en cuatro, LMA de primera recaída en once, LMA de segunda recaída en ocho y LMA resistente en doce pacientes. Un paciente tuvo SMD. Siete pacientes con LMA tuvieron una historia de SMD, y uno tuvo una historia de LMA secundaria. Un paciente había recibido previamente un trasplante autólogo o alógeno de células madre cada uno. Las citogenéticas fueron desfavorables en doce que incluían el paciente con SMD, intermedio en veintiuno y no hechas en tres. Siete pacientes se trataron con 4 mg/kg, ocho pacientes se trataron con 5,3 µg/kg, doce pacientes se trataron con 7,1 mg/kg y ocho pacientes se trataron con 9,4 µg/kg, un paciente se trató con 12,5 µg/kg de DT<sub>388</sub>L-3.
- 25

Paciente N.º	Edad (años)/sexo	Estado de enfermedad	Historia de tratamiento	Citogenética
1	38/M	1º rel	7 + 3; HiDAC	Normal
2	53/F	2º rel	7 + 3/Ida/Ara-C; 7 + 3/Ida/Ara-C; 5 + 3/Ida/Ara-c Mylotarg	+8
3º	67/F	1º rel	Carbo/Taxol; Gleevea luego Ida/Citarabina; Mylotarg	-4, -18, -19, del 5, +7

Tabla 6 Características clínicas de pacientes con LMA tratados con DT <sub>388</sub> IL3				
Paciente N.º	Edad (años)/sexo	Estado de enfermedad	Historia de tratamiento	Citogenética
4 <sup>a</sup>	67/F	2º rel	Ida/Ara-C; Mylotarg; Campath/Cytoxan; madre alógenas; Mylotarg; DLI; DLI; Mylotarg; DLI	Normal
5	57/M	1º rel	7&3/Citarabina/Dauno; 5&2/Citarabina/dauno; Citarabina/Mylotarg; Cytoxan/VP-18	+13
6 <sup>a</sup>	54/M	2º rel	Ara-C/Ida; Ara-C/Gem/CPT-11; Ara-C/etopósido; trasplante de células madre; BiSusulphace/VP-18; madre autólogas	-7
7 <sup>b</sup>	51/M	2º rel	7 + 3 + 3; Ara-C/L-asparaginasa; Ara-C/VP-16, Busulfán/ VP-16 más madre autólogas; Ara-C/Mito/L-asparaginasa; Ara-C/Mito/L-asparaginasa; Mylotarg	t (6; 12)
8	82/M	1º rel	Citarabina/Dauno	t(3; 21)(q26; q26)
9	83/M	1º rel	Citarabina/Dauno	Normal
10	89/M	1º rel	Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C	Normal
11	54/F	Ref	ERYC/Ida (7 + 3); ERYC	Normal
12	81/F	De Novo		+8, +9
13	76/M	2º rel	Ida/Ara-C; VP16/Mito/Ara-C; Mylotarg; Vion/Timidor; Gem/Fludarabina/Mito	Normal
14	67/F	Ref	Inducción de ERYC/Ida (7 + 3)	t(11; 18) (q25; q21), del (9) (p22p24); +8
15	25/F	2º rel	Terapia de inducción de 7 + 3; minl VP-16/Cytoxan/ Ara-C; re-inducción de CECA seguido de 7 + 3	t(9; 11) (p22; q23)
16	44/F	Ref	HiDAC/dauno; VP-16/Ciclofosfamida	Normal
17	62/M	Ref	Terapia de inducción de 7 + 3; 6 + 2/Citarabina/Asparaginasa; Clorotoxina/Tomodar; Mitn/Gem/Fludarabina	t(1; 4) (q42; q21), t(4; 12) (q12; p13)
18	62/F	1º rel	Inducción de 7 + 3	Normal
19	72/F	Ref	Inducción de 7 + 3	Normal
20	62/M	1º rel	Citarabina/Ida	añadir (2) (p21), añadir (3) (p25), -4, -7, si. del (17) (q23), dsll, del (11) (q23)
21 <sup>b</sup>	59/F	1º rel	Ara-C/dauno; rescate con VP-16/ciclo	t (1; 5)
22	32/M	Ref	Ara-C/dauno; VP-16/Mito; Ara-C/dauno; VP-16/Cytoxan	del (7) (q22q34)
23	73/F	1º rel	Ciclosporina, daunorubicina, citarabina	+11, -12, der (17) t (12; 17) (q10; p12)

Paciente N.º	Edad (años)/sexo	Estado de enfermedad	Historia de tratamiento	Citogenética
24	33/M	2º rel	ADE-10; MACE/Midac; Hydrea/leucoforesis; Citosina/Ara-C	Normal
25 <sup>b</sup>	66/F	Ref	Revlimid, 7 + 3, L-001281814/MK0457	del (5) (q23), -12, -13, añadir (16) (q22), + mero 20
26	73/F	Ref	Ara-C/dauno; 7 + 3	Normal
27	70/F	De Novo		ND
28	60/M	Ref	7 + 3	del (5)
29	41/F	2º rel	7 + 3; Hi-Dos Citarabina; re-inducción de 7 + 3	Normal
30	32/M	Ref	HiDAC/dauno; VP-16/Ciclofosfamida; HiDAC	ND
31 <sup>b</sup>	77/M	De Novo		Normal
32 <sup>b</sup>	72/M	Ref	Ara-C	-Y
33	78/M	1º rel	7 + 3; Hi-Dos Citarabina	Normal
34	77/M	De Novo		ND
35 <sup>b</sup>	65/M	Ref	7 + 3, Ara-C de alta dosis, PT-523	(q5), del (7), t (16; 17)
36	71/M	MDS	6-azacitidina; decitabina	-7

<sup>a</sup> El paciente 4 tuvo un trasplante alógeno, y el paciente 6 tuvo un trasplante autólogo.  
<sup>b</sup> El paciente 3 tuvo una historia de LMA secundaria. El paciente 7, 21, 25, 31, 32 y 35 tuvo una historia previa de SMD.

### 6.2.3 RESULTADOS - TOXICIDADES

Las toxicidades relacionadas con el fármaco fueron de leves a moderadas y transitorias que incluyen fiebre, escalofríos, hipotensión, síndrome de fuga vascular, hipoxemia, hipocalcemia, transaminasemia e hipoalbuminemia (Tabla 7 y Figura 5). No hay correlación del nivel de dosis con la incidencia de toxicidad o grado.

5

Paciente N.º	Nivel de dosis (ug/kg)	Toxicidades Gr2 CTCV3	C <sub>máx</sub> d1/d12 (mg/ml)		Anticuerpo anti-DT (mg/ml)			Respuesta clínica
			d1	d12	d1	d15	d30	
1	4	N-V, Trans	0	0	0,8	23	235	0
2	4	0	0	0	2,5	ND	ND	0
3	4	F, N-V, Alb, Hipo	0	0,18	0	ND	36	0
4	4	F, Alb	ND	ND	0	ND	ND	0
5	4	F, Alb	ND	ND	0	ND	48	0
6	4	Hipo	ND	ND	0,9	ND	36	0
7	4	Alb	0	0	2,2	1	6,2	0

ES 2 646 545 T3

TABLA 7 Resultados de toxicidades de pacientes tratados con DT <sub>388</sub> L3, farmacocinética, respuesta inmunitaria y respuesta clínica*								
Paciente N.º	Nivel de dosis (ug/kg)	Toxicidades Gr2 CTCV3	Cmáx d1/d12 (mg/ml)		Anticuerpo anti-DT (mg/ml)			Respuesta clínica
					d1	d15	d30	
8	5,32	Alb	0,19	0	1	221	263	0
9	5,32	Alb, Trans	0,14	0,15	0,8	440	ND	PR
10	5,32	Alb	0,22	ND	0,5	ND	1,1	0
11	5,32	F, Alb, Trans	0	ND	2,5	ND	ND	0
12	5,32	Hipo, F, Alb	0,34	0	1,3	600	ND	0
13	5,32	Alb	0	0,3	1,5	ND	ND	MR
14	5,32	Alb, Trans	0,38	0,36	0,3	0,3	ND	MR
15	5,32	Alb, Trans	0,06	0,29	0	1,6	29	MR
16	7,07	Alb, Trans	ND	0,21	1	0	ND	0
17	7,07	Alb	ND	ND	1,2	ND	ND	0
18	7,07	F, Alb, Disn	0,22	0,37	0,7	0,4	ND	0
19	7,07	VLS, Alb, Disn	0,32	0,54	0,8	8,3	22,4	CR
20	7,07	Alb, Trans	0,48	ND	0,4	ND	ND	0
21	7,07	Alb, Trans	0,08	0,35	2,1	1,5	4,2	0
22	7,07	Alb, Trans	0,13	0,29	1,7	1,2	ND	0
23	7,07	F, Alb, VLS	0,61	ND	2,2	32	104	PR
24	7,07	0	0	0,38	4,3	ND	4	0
25	7,07	Alb	0,11	ND	3,8	ND	ND	0
26	7,07	F, Alb, Trans	0,23	ND	0,5	ND	ND	0
27	9,4	F, Alb, Trans	0,18	ND	3	ND	ND	0
28	9,4	F, Alb	0,27	ND	1,3	300	ND	0
29	7,07	F, Alb	ND	ND	1,5	ND	ND	0
30	9,4	Alb	0,15	0,32	3	0,8	ND	0
31	9,4	F, Trans	0,23	ND	2,3	ND	ND	0
32	9,4	Alb, Trans	0,26	0,38	2,2	3,1	ND	0
33	9,4	Alb, Trans	0,37	ND	1,2	ND	ND	0
34	9,4	Alb, Trans	0,55	ND	2,2	ND	306	0
35	9,4	Alb	0,23	0	0,8	252	ND	0
36	12,5	Alb, Trans	0,34	ND	1,3	11,2	16,8	PR

\* F = fiebre, N-V = náuseas y vómitos, Trans = transaminasemia, VLS = síndrome de fuga vascular, Alb = hipoalbuminemia, Hipo = hipotensión, Disn = disnea, ND = no determinado, MR = respuesta mínima, PR = respuesta parcial, CR = respuesta completa.

**6.2.4 RESULTADOS - RESPUESTA INMUNITARIA**

5 Los títulos de anticuerpos de pretratamiento oscilaron de 0 a 4,3 µg/ml (media = 2,3 µg/ml); los títulos de anticuerpos del día 15 fueron 0 a 600 µg/ml (media = 92 µg/ml); los títulos de anticuerpos del día 30 fueron 1,1 a 306 µg/ml (media = 81 µg/ml). Basándose en los altos títulos de anticuerpos de > 8 µg/ml, las 25 muestras fueron de pretratamiento bajo; nueve muestras fueron bajas en el día 15 y nueve muestras altas en el día 15; cuatro muestras fueron bajas en el día 30 y diez muestras altas en el día 30. C<sub>máx</sub> no se correlacionó con la respuesta (p = 0,23).

**6.2.5 RESULTADOS - RESPUESTA CLÍNICA**

10 Entre treinta y seis pacientes evaluables, se observaron lo siguiente: una CR de LMA citogenética durante 8 meses; dos remisiones parciales de LMA (PR) que duraron uno y tres meses; tres respuestas mínimas de LMA con eliminación de blastos periféricos y citorreducciones de blastos de médula ósea del 89 %, 90 % y 93 % que duraron de uno a dos meses; y una remisión parcial de SMD que duró más de un mes con reducción de blastos del 10 % al 2 % y normalización de recuentos periféricos (Tabla 8 y Figura 8A-D).

Paciente N.º	Nivel de dosis	% de blastos pre-tratamiento	Respuesta global	Longitud de respuesta (meses)
9	5,32	50 %	PR	1
13	5,32	69 %	MR con 93 % de reducción*	2
14	5,32	90 %	MR con 89 % de reducción*	1
15	5,32	80 %	MR con 90 % de reducción*	1
19	7,07	30 %	CR	8
23	7,07	39 %	PR	3
36	12,5	10 %	PR	>1

\*Citorreducción calculada a partir del cambio en el índice de blastos de médula ósea = % de blastos x % de celularidad.

**7. EQUIVALENTES**

15 La presente invención no debe limitarse en alcance por las realizaciones específicas descritas que están previstas como ilustraciones únicas de aspectos individuales de la invención, y métodos funcionalmente equivalentes y componentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia de la descripción anterior y dibujos adjuntos usando no más que experimentación rutinaria. Tales modificaciones y equivalentes pretenden entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina-3 humana (IL-3)-toxina diftérica para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un ser humano, en la que dicho método comprende la administración del conjugado de IL-3-toxina diftérica a una dosis de aproximadamente 4 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg a aproximadamente 12,5 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg a aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 5,3 µg/kg, aproximadamente 7,1 µg/kg, aproximadamente 9,4 µg/kg o aproximadamente 12,5 µg/kg por día, en la que dicho cáncer se caracteriza por células que expresan IL-3R; y en la que el término aproximadamente representa un valor que es no superior al 10 % por encima o por debajo de la dosis establecida.
2. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina-3 humana (IL-3)-toxina diftérica para su uso en un método de tratamiento de síndrome mielodisplásico en un ser humano, en la que dicho método comprende la administración del conjugado de IL-3-toxina diftérica a una dosis de aproximadamente 4 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg a aproximadamente 12,5 µg/kg, aproximadamente 4 µg/kg a aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 5,3 µg/kg, aproximadamente 7,1 µg/kg, aproximadamente 9,4 µg/kg o aproximadamente 12,5 µg/kg por día, en la que dicho síndrome mielodisplásico se caracteriza por células que expresan IL-3R; y en la que el término aproximadamente representa un valor que es no superior al 10 % por encima o por debajo de la dosis establecida.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las células que expresan IL-3R son células madre de cáncer.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el conjugado de IL-3-toxina diftérica se administra a una dosis que es la máxima dosis tolerada.
5. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el conjugado de IL-3-toxina diftérica se administra al menos dos veces a la semana, o al menos tres veces a la semana.
6. La composición para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el conjugado de IL-3-toxina diftérica se administra durante un periodo de dos semanas o más.
7. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el cáncer se caracteriza por IL-3R que se expresa en exceso en células que normalmente expresan IL-3R, o siendo IL-3R inapropiadamente expresado en células que no expresan normalmente el IL-3R.
8. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el cáncer es resistente.
9. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el ser humano:
- está en un estado de remisión del cáncer;
- ha sido previamente tratado con agentes terapéuticos y/o ha recibido radioterapia;
- está actualmente siendo administrado con un agente terapéutico y/o está recibiendo radioterapia; o
- ha recaído del cáncer o ha fracasado en el tratamiento para el cáncer.
10. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que el cáncer es leucemia mieloide aguda.
11. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el conjugado es un conjugado químico.
12. La composición para el uso de la reivindicación 11, en la que la porción de toxina diftérica del conjugado químico está unida mediante un enlace covalente a la porción de IL-3 humana del conjugado.
13. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que el conjugado es una proteína recombinantemente expresada.
14. La composición para el uso de la reivindicación 13, en la que el conjugado se expresa como un polipéptido monocatenario que comprende los dominios catalítico y de translocación de toxina diftérica e IL-3 humana.
15. La composición para el uso de la reivindicación 14, en la que el conjugado comprende los restos de aminoácidos 1 a 388 de la toxina diftérica unida mediante un enlace peptídico a IL-3 humana.

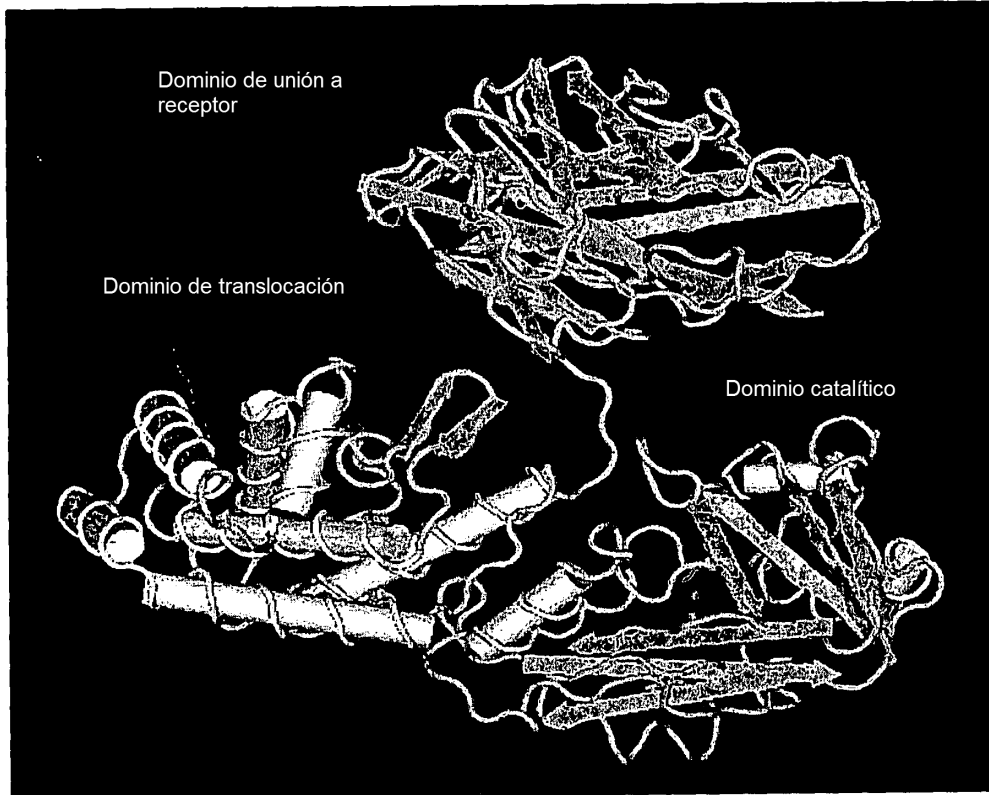
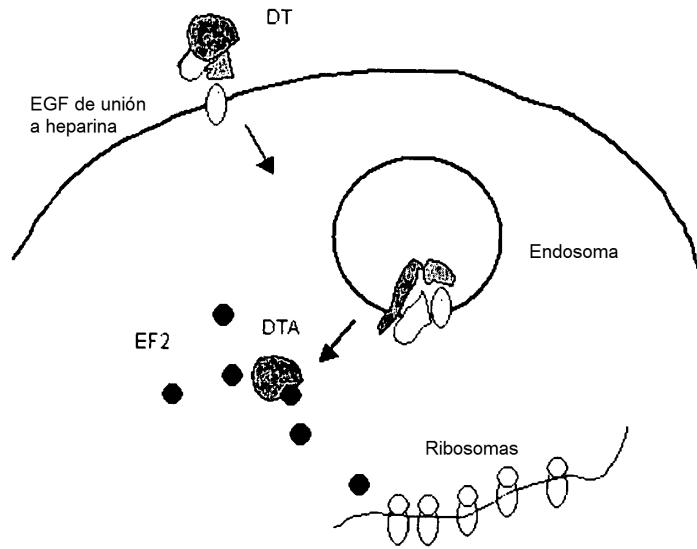


FIG. 1



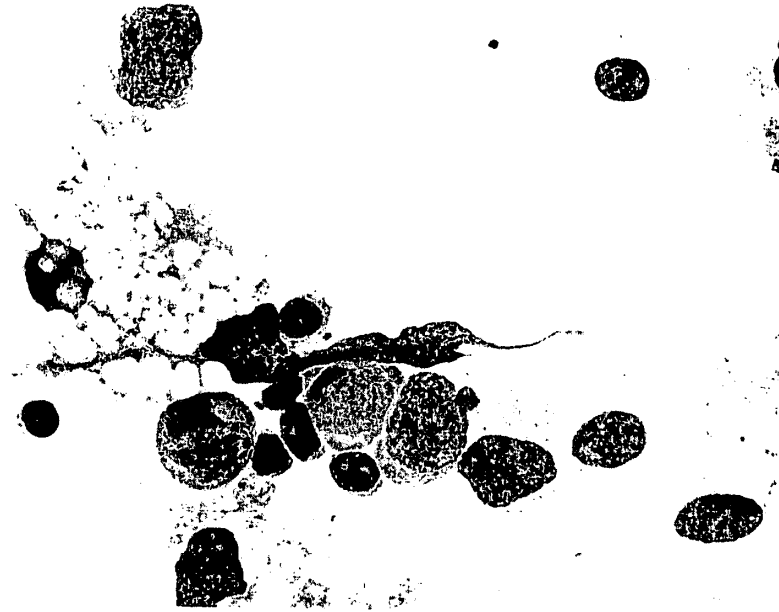


**FIG. 2**



**FIG. 3**

A.



B.

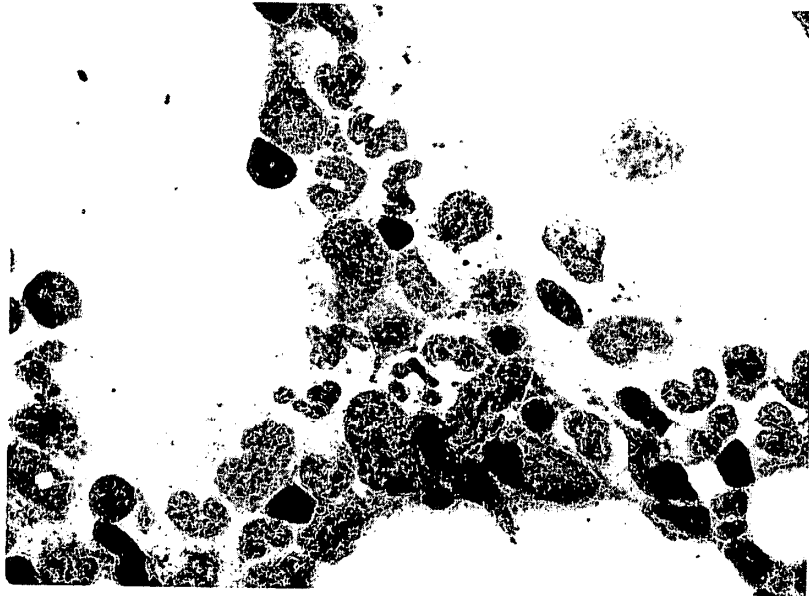


FIG. 4

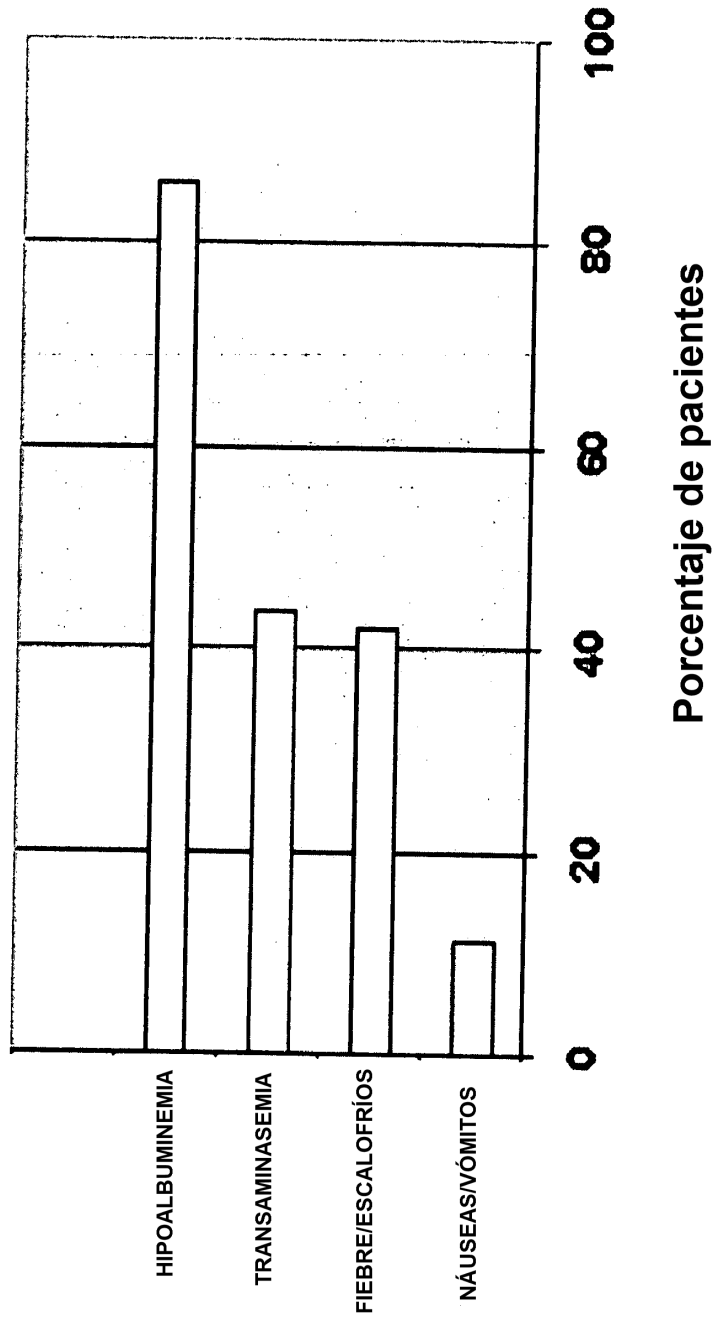


FIG. 5

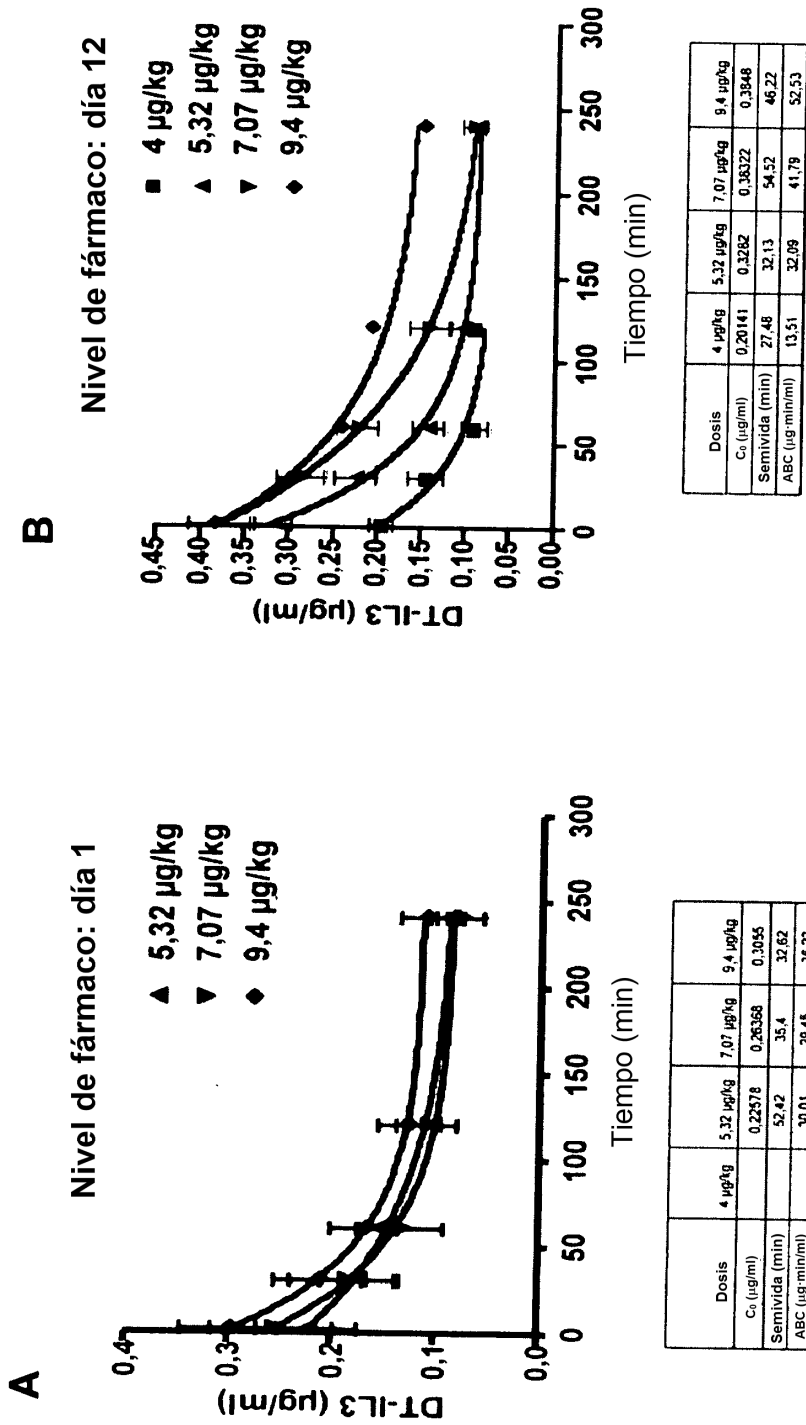
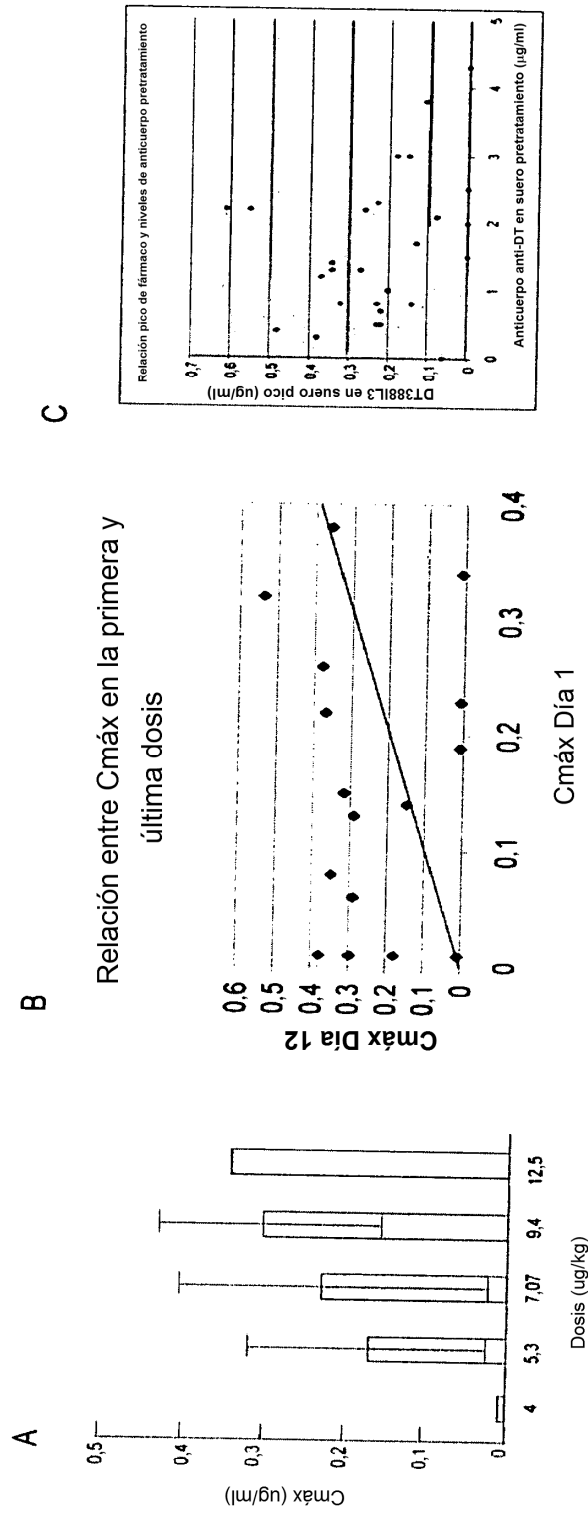


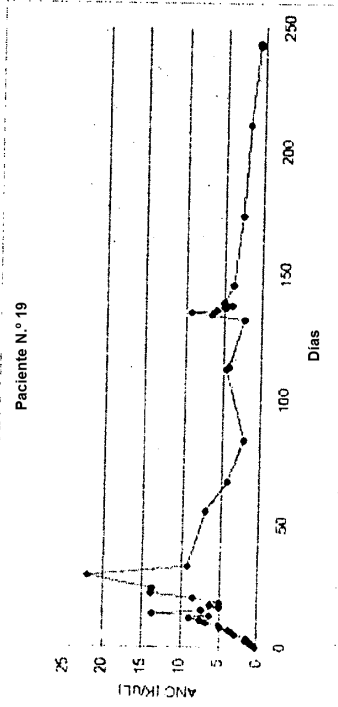
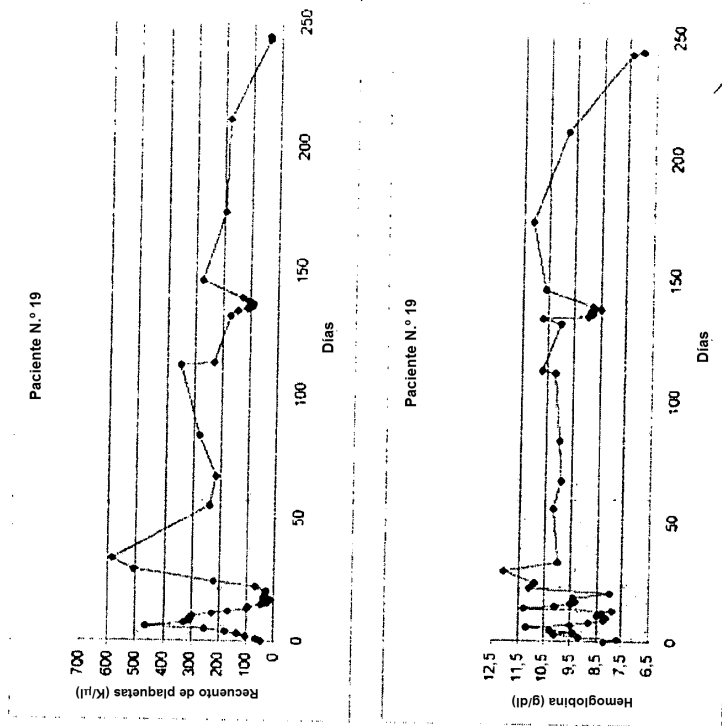
FIG. 6



**FIG. 7**



B

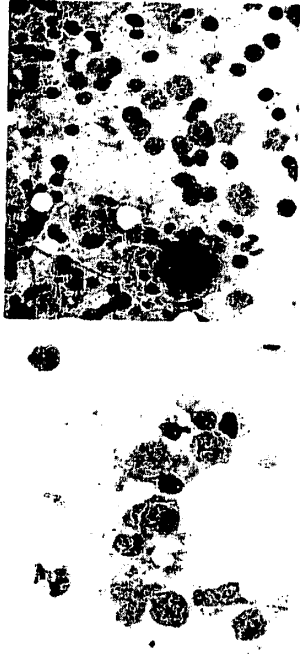


FIGS. 8A-8B

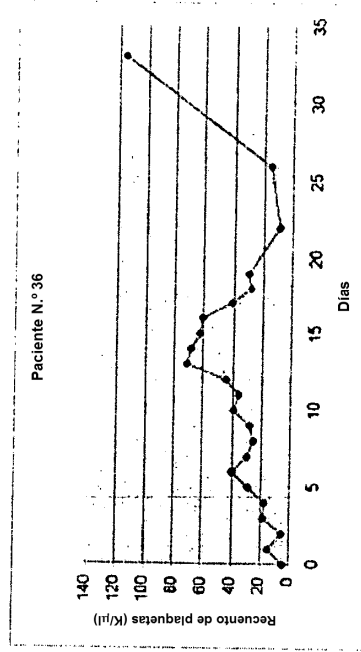
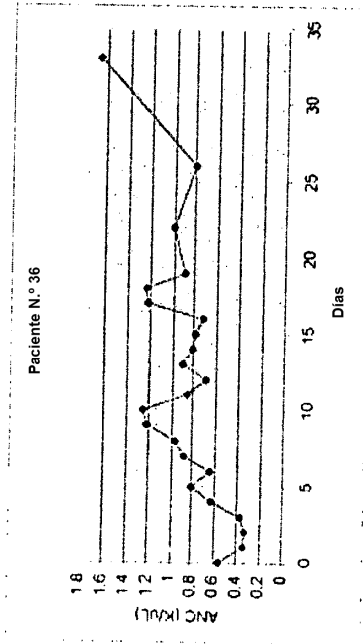
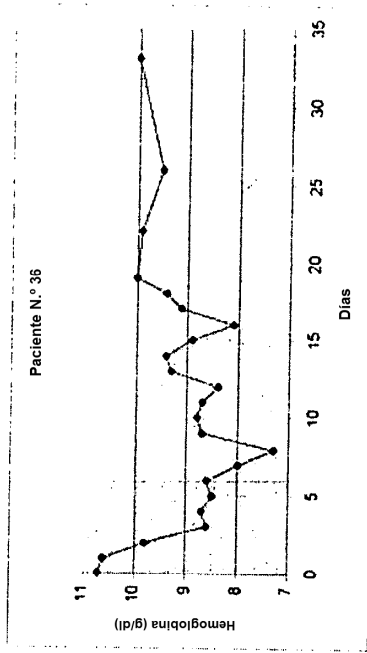
C

PRE

POST



D



FIGS. 8C-8D



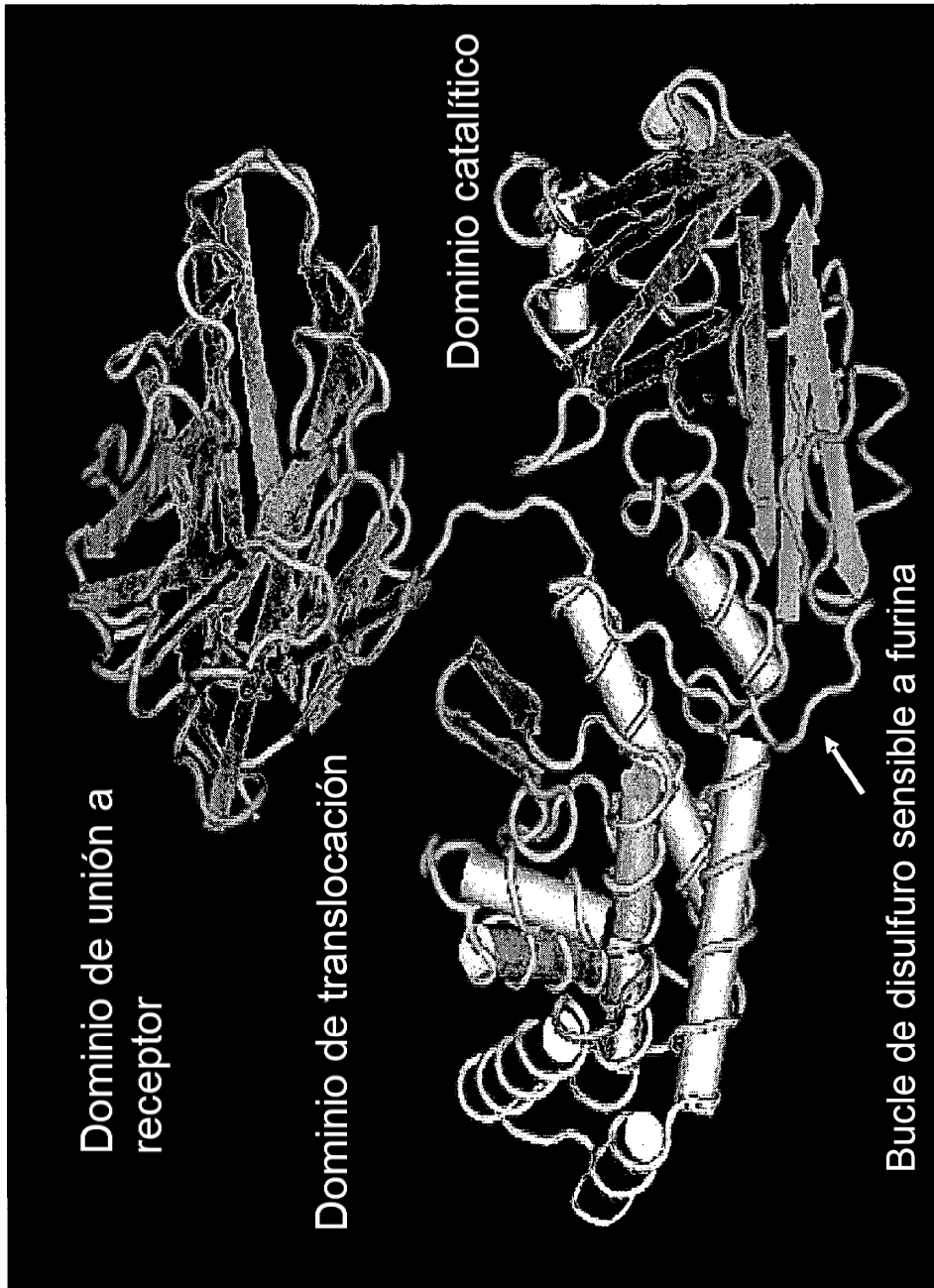


Fig. 1

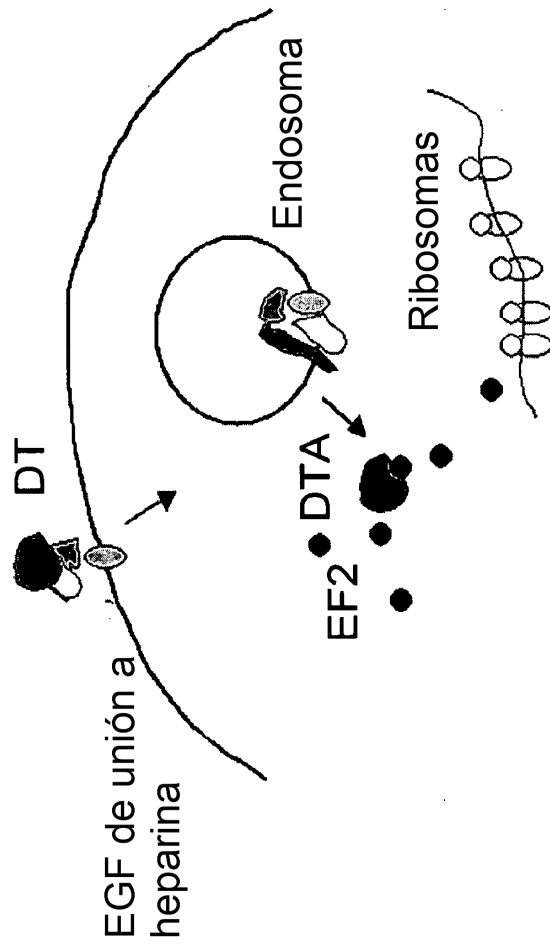


Fig. 2



Fig. 3

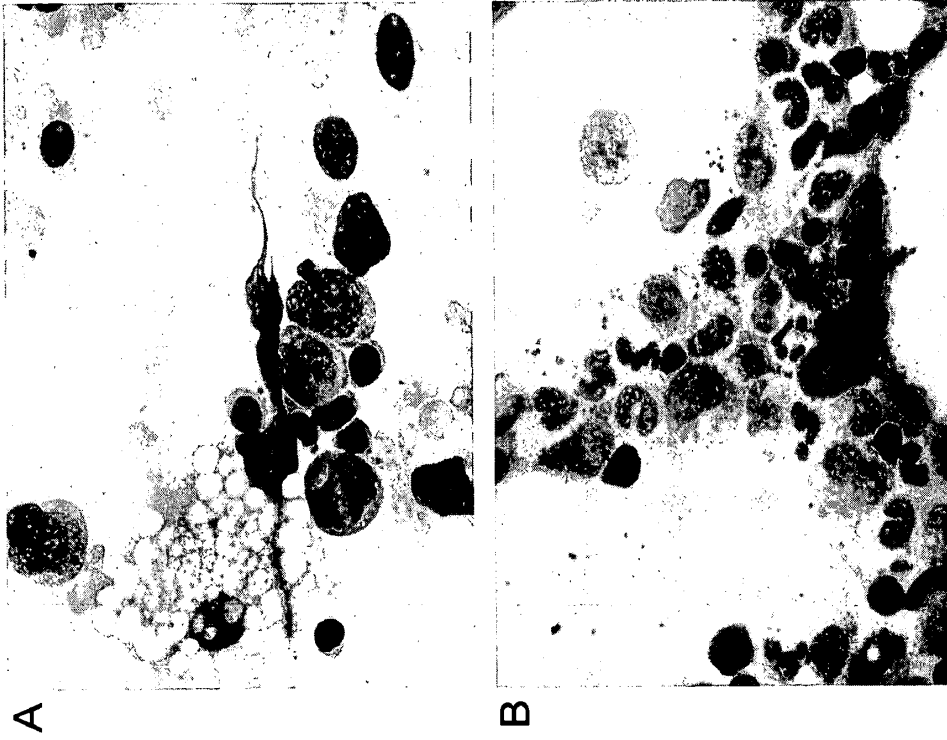


Fig. 4

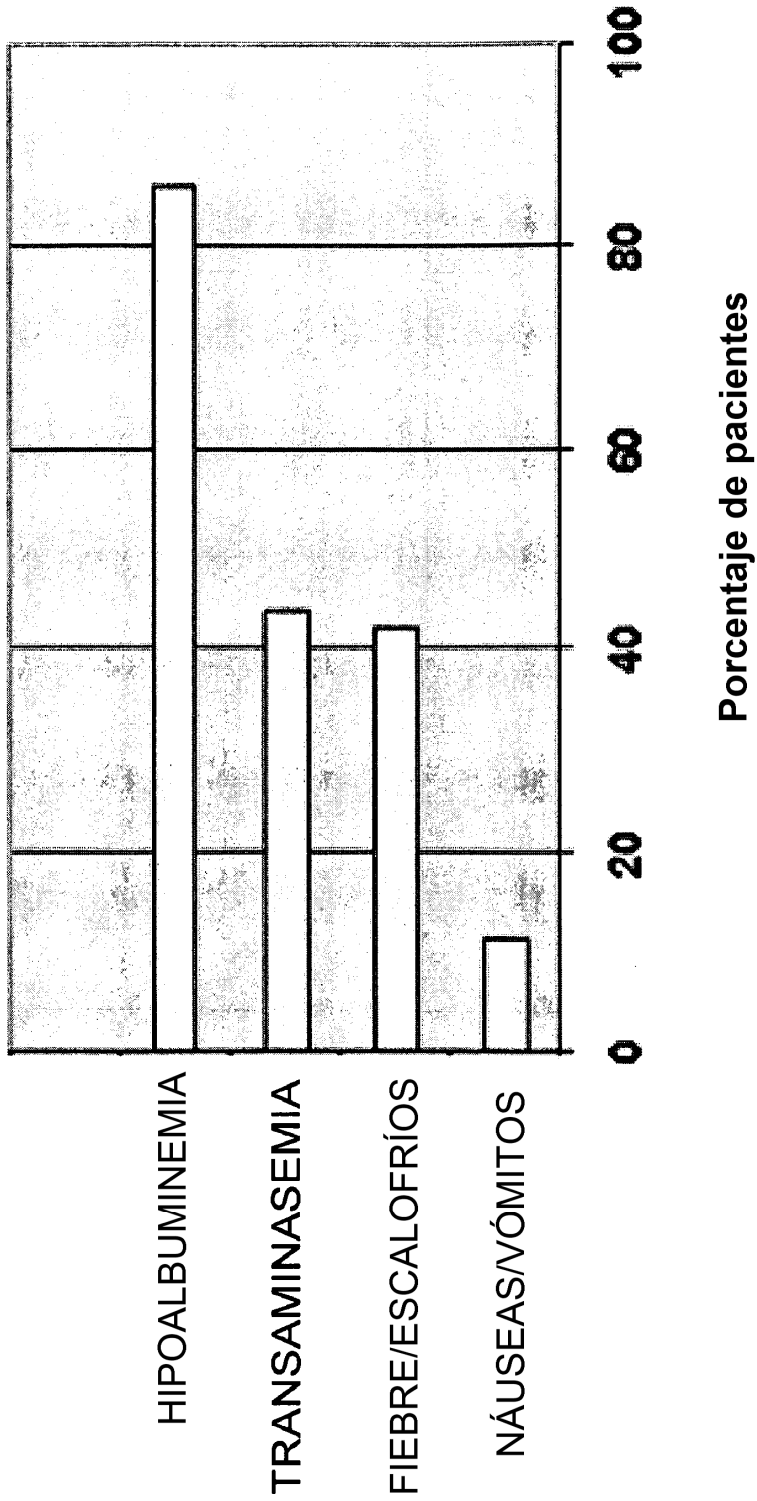
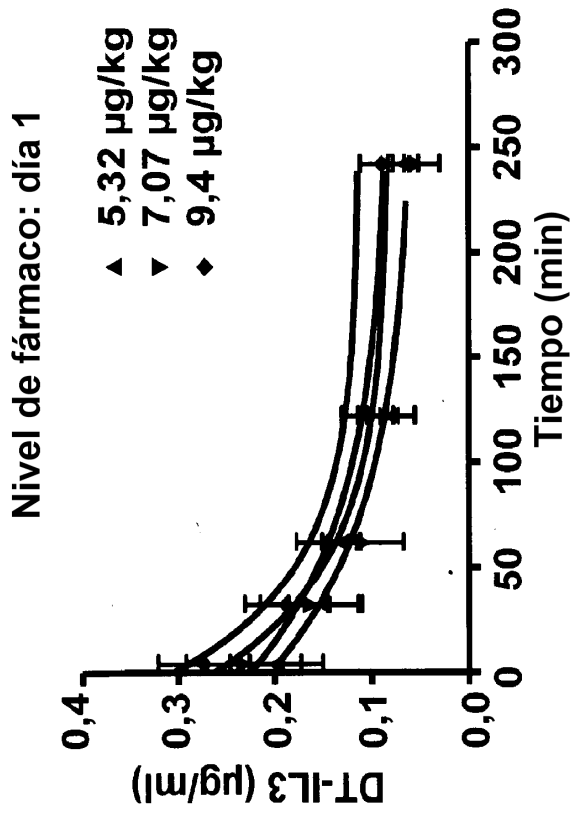
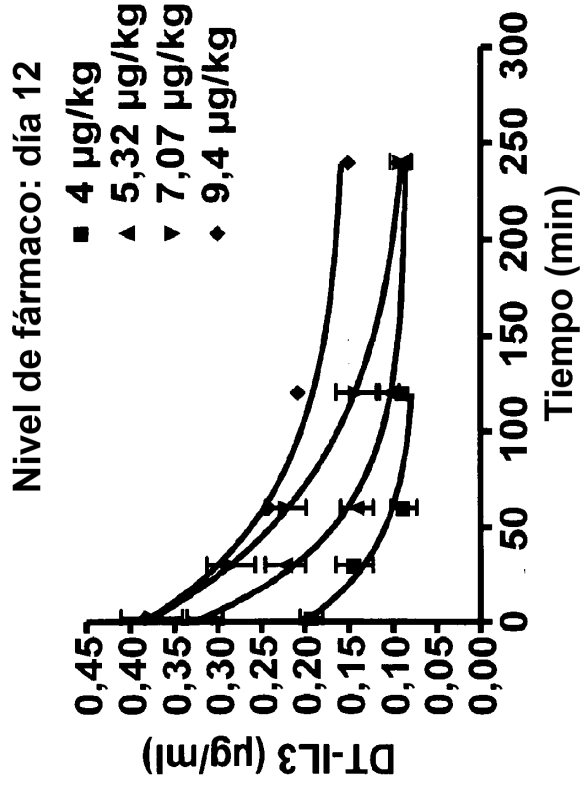


Fig. 5



Dosis	4 µg/kg	5,32 µg/kg	7,07 µg/kg	9,4 µg/kg
C <sub>0</sub> (µg/ml)		0,22578	0,26368	0,3055
Semivida (min)		52,42	35,4	32,62
ABC (µg·min/ml)		30,01	29,45	36,23

Fig. 6A



Dosis	4 µg/kg	5,32 µg/kg	7,07 µg/kg	9,4 µg/kg
C <sub>0</sub> (µg/ml)	0,20141	0,3282	0,38322	0,3848
Semivida (min)	27,48	32,13	54,52	46,22
ABC (µg·min/ml)	13,51	32,09	41,79	52,53

Fig. 6B

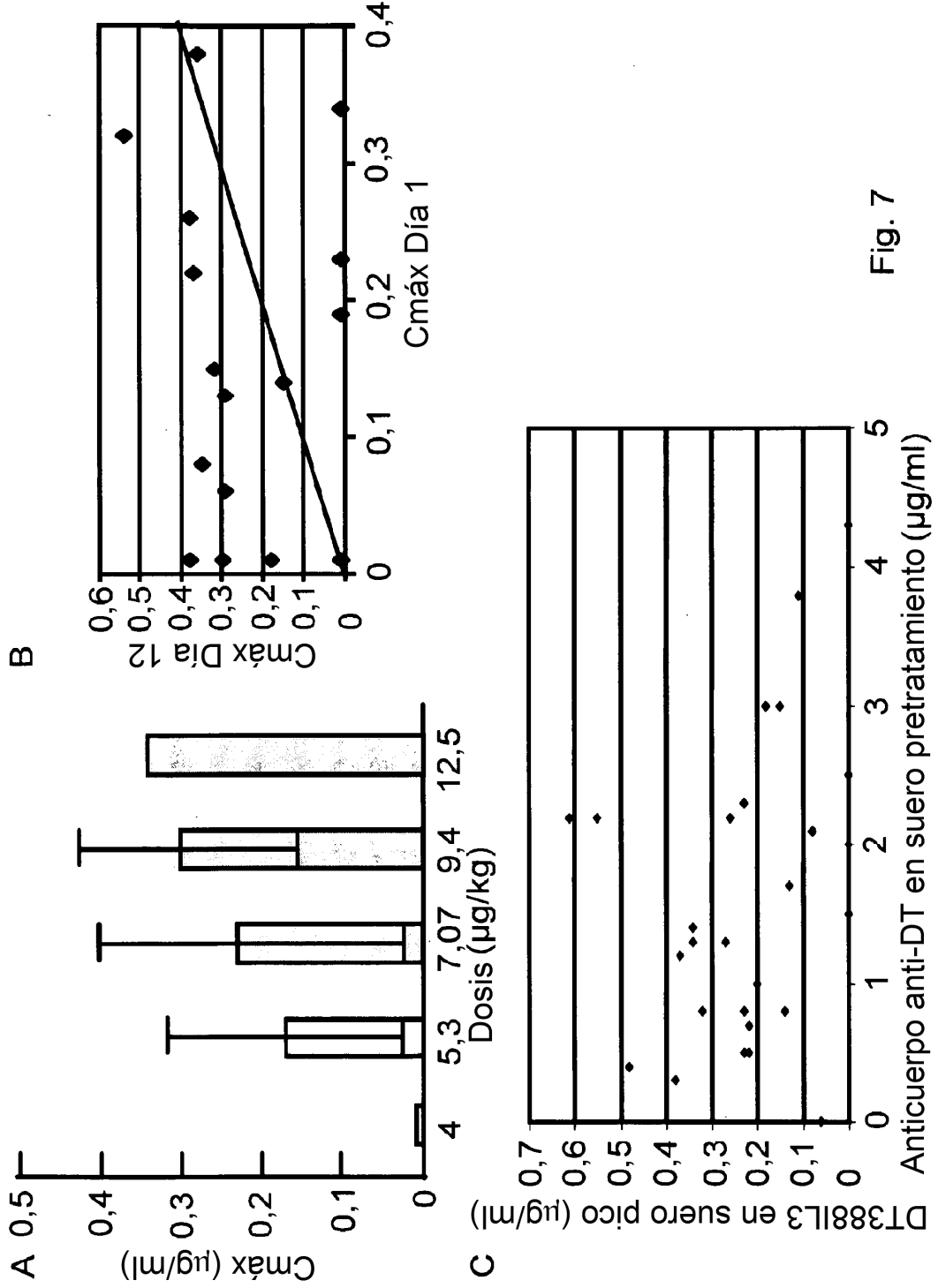


Fig. 7



POST



PRE

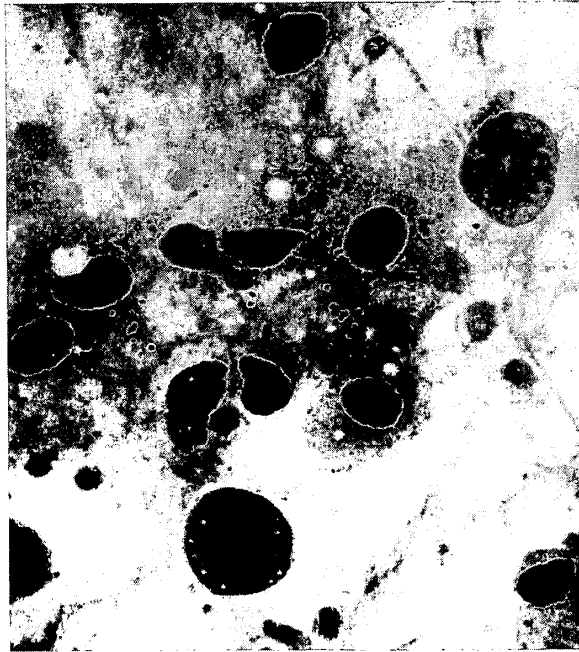


Fig. 8A

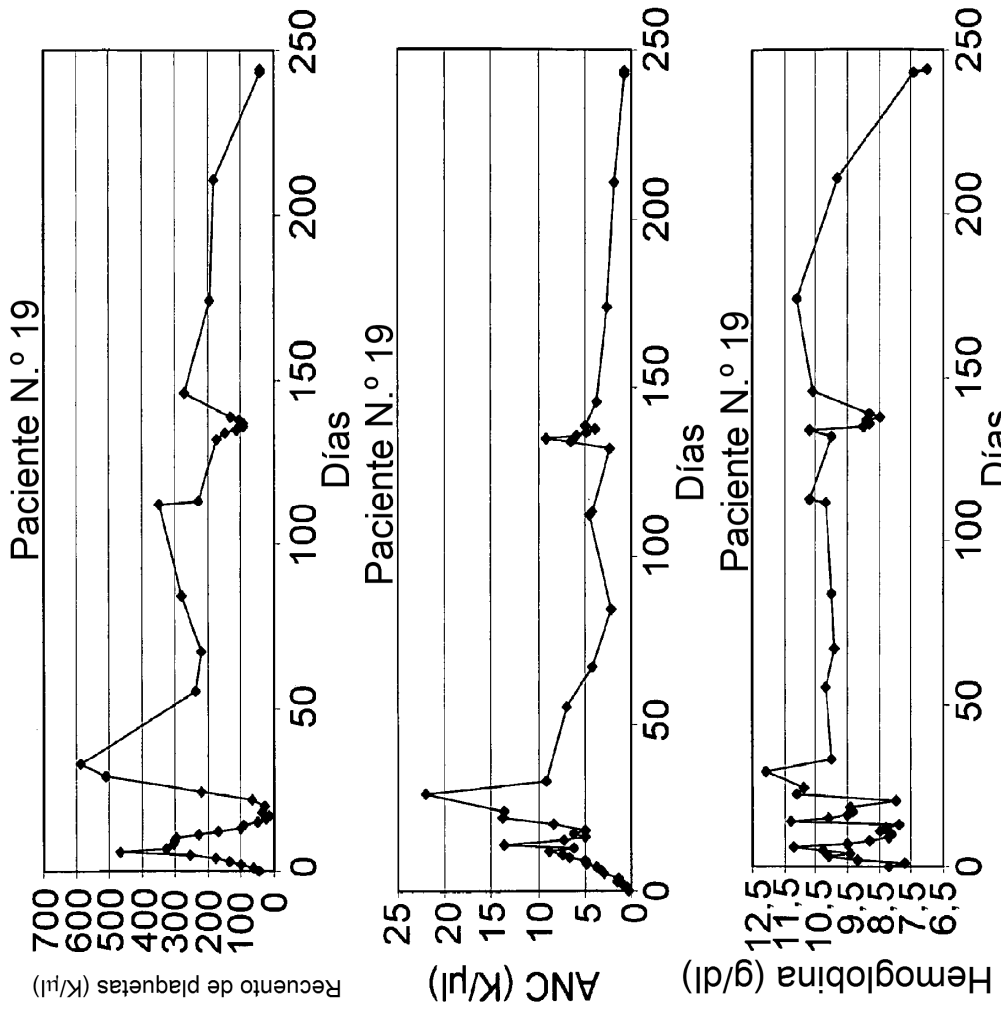
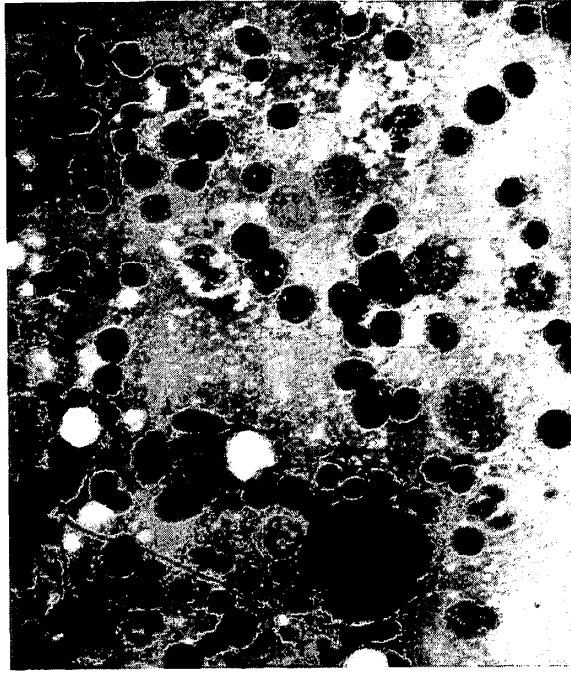


Fig. 8B

POST



PRE



Fig. 8C

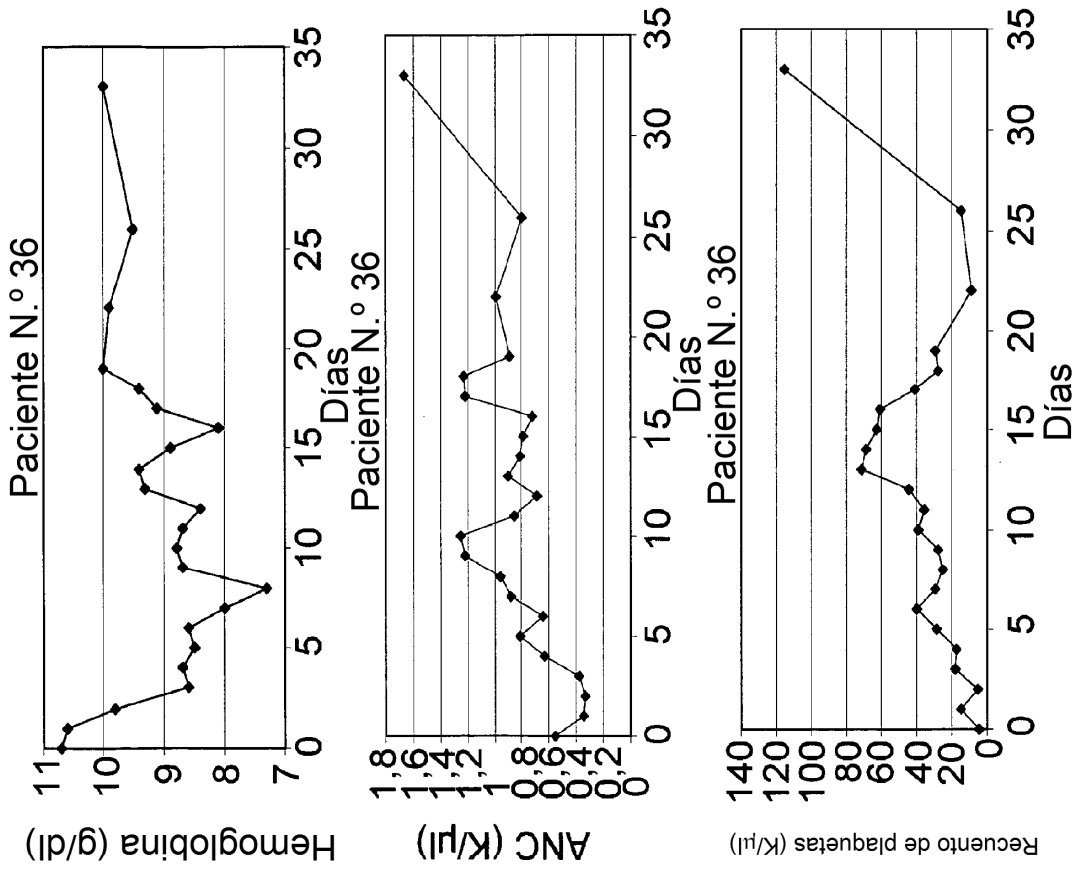


Fig. 8D