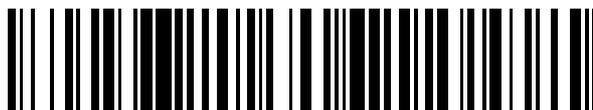


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 596**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**A61K 31/506** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2012 PCT/IL2012/050207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12801087 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2720720**

54 Título: **Terapia de combinación para prevenir la formación del DCIS y la progresión hasta cáncer de mama**

30 Prioridad:  
**14.06.2011 US 201161496577 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.05.2018**

73 Titular/es:  
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.  
(100.0%)  
At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95  
7610002 Rehovot , IL**

72 Inventor/es:  
**YARDEN, YOSEF y  
CHALUVALLY-RAGHAVAN, PRADEEP**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 670 596 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**

Terapia de combinación para prevenir la formación del DCIS y la progresión hasta cáncer de mama

La presente invención se refiere a una combinación de un primer y un segundo agentes para uso en el tratamiento de una lesión de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) de acuerdo con la reivindicación 1, y un método para clasificar DCIS en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 2.

La glándula mamaria crece rápidamente en la pubertad para producir una compleja estructura en forma de árbol compuesta por una capa interna de células luminales, que están rodeadas por una capa externa de células mioepiteliales. Durante cada ciclo menstrual y, aún más drásticamente, con cada embarazo ocurren ciclos posteriores de expansión e involución. Entre los mecanismos subyacentes a la formación del lumen de los conductos mamarios se incluyen las divisiones celulares con las placas de metafase organizadas perpendicularmente a la superficie apical y la apoptosis luminal promovida por la separación de las capas de células internas de la membrana basal. Sin embargo, los mecanismos exactos que regulan la renovación del conducto y la apoptosis, así como su relevancia para la transformación maligna, aún no se conocen por completo. De acuerdo con los diversos mecanismos y la heterogeneidad del tipo celular, los tumores mamarios humanos muestran una marcada diversidad morfológica y molecular. Un subtipo agresivo, que comprende 20-25% de todos los carcinomas ductales invasivos, se caracteriza por la amplificación del gen *HER2*, lo que da como resultado la sobreexpresión de la oncoproteína HER2 codificada (también conocida como ERBB-2/Neu). Se ha demostrado que el tratamiento con Trastuzumab, un anticuerpo específico para HER2, mejora los resultados para las mujeres con alto riesgo de tumores de mama en etapa temprana o metastásicos que sobreexpresan HER2.

Otra ruta de transducción de señal crítica para la progresión del cáncer de mama comprende receptores de la familia Notch y sus ligandos unidos a la membrana. La familia incluye cuatro receptores transmembrana conservados (Notch1 a Notch4) y cinco ligandos localizados en la superficie (Jagged1, Jagged2, Delta tipo 1 a Delta tipo 3), que desempeñan papeles fundamentales en la autorrenovación y proliferación de células madre progenitoras y adultas de la glándula mamaria. Por ejemplo, Notch1 y Notch3 regulan la expresión de c-Myc y ciclina D1 para promover la proliferación celular. La señalización Notch se activa a través de interacciones receptor-ligando entre células vecinas, lo que da como resultado sucesivas escisiones proteolíticas de las proteínas Notch por la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral (TACE, también llamada ADAM17) y el complejo  $\gamma$ -secretasa. Esto libera el dominio intracelular Notch (NICD) de la membrana plasmática, lo que permite su translocación en el núcleo y la formación de un complejo activador transcripcional trimérico con una proteína de unión al ADN, CSL (también denominado CBF-1 y RBP-J $\kappa$ ) y Mastermind. El complejo induce la transcripción de las familias de genes HERP y HES, regulando así la expresión de múltiples genes implicados en el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular.

Imatani y Callahan 2000, Oncogene 19: 223-231, Stylianou et al., 2006, Cancer Res 66: 1517-1525 enseñan que la actividad promotora de supervivencia de la vía probablemente subyace a la capacidad observada de los miembros de la familia Notch para promover tumores mamarios.

Reedijk et al., 2005, Cancer Res 65: 8530-8537 enseñan que, en seres humanos, la alta coexpresión de Notch1 y su ligando, JAG-1, se asocia con una supervivencia global deficiente de pacientes con cáncer de mama.

Osipo et al. [Oncogene. Agosto 28 de 2008; 27 (37): 5019-32, 2008] enseña la administración de un inhibidor de HER2 y un inhibidor de gamma secretasa para el tratamiento del cáncer de mama.

Han et al., [Resumen No. 3028, reunión anual de ASCO de 2011] enseña una terapia de combinación para el tratamiento del cáncer usando un inhibidor de HER2 (trastuzumab y lapatinib) y un inhibidor de AKT (MK2206).

Farnie, G. et al. (2007) J NATL CANCER INST., 99 (8): 616-27 divulgan los efectos de la inhibición de la ruta NOTCH [por un inhibidor de gamma secretasa (DAPT) o un anticuerpo neutralizante de Notch 4] o EGFR (por gefitinib) en DCIS;

Gunter Von Minckwits et al. (2011) BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, 132 (3): 863-870 enseña el uso de Trastuzumab en combinación con quimioterapia para el tratamiento del DCIS; y

Sara A. Lari et al. (2011) Journal of Cancer, 30: 232 divulga marcadores biológicos en DCIS.

**Sumario de la invención**

La combinación de un primer y un segundo agentes para uso en el tratamiento de una lesión de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) de la presente invención se define en la reivindicación 1, y el método de clasificación de DCIS en un sujeto se define en la reivindicación 2.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar una lesión de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método

administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente capaz de regular a la baja la actividad y/o expresión de al menos un componente que participa en una ruta NOTCH, y un segundo agente capaz de regular a la baja la actividad y/o expresión de HER2, tratando así la lesión DCIS.

- 5 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método para clasificar DCIS en un sujeto que comprende analizar una expresión de HER2 y al menos un componente que participa en una ruta NOTCH en una muestra de mama del sujeto, en donde una expresión de cada uno de HER2 y el al menos un componente que participa en una ruta NOTCH por encima de un nivel predeterminado es indicativo de una lesión agresiva de DCIS.

La divulgación se refiere además a lo siguiente.

- 10 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método 10 comprende además analizar en una muestra de mama del sujeto una expresión del al menos un componente que participa en una ruta NOTCH, antes del tratamiento.

De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además analizar en una muestra de mama del sujeto una expresión de HER2 antes del tratamiento.

- 15 De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, el segundo agente es un anticuerpo.

De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, el anticuerpo comprende Trastuzumab.

- 20 De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, el segundo agente es un inhibidor de quinasa.

De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, el inhibidor de quinasa es lapatinib.

- 25 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el al menos un componente se selecciona del grupo que consiste en HES1 (siglas en inglés de *Hairy and Enhancer of Split 1*), NOTCH 2 y NOTCH 3, ADAM17 y Presenilina 1.

De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, al menos un componente es NOTCH3.

De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, el primer agente es una molécula de ARNpi.

- 30 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el primer agente es un inhibidor de gamma secretasa, un inhibidor específico de proteína quinasa activada por mitógeno (MEK) o un inhibidor de PI3K-AKT.

De acuerdo con aún otras características en las realizaciones preferidas descritas, el primer agente es un inhibidor de gamma secretasa.

- 35 De acuerdo con otras características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el componente que participa en una ruta NOTCH se selecciona del grupo que consiste en NOTCH3, HES1 y presenilina.

- 40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de las realizaciones de la invención, a continuación se describen ejemplos de métodos y/o materiales. En caso de conflicto, primará la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

#### Breve descripción de los dibujos

- 45 Algunas realizaciones de la divulgación se describen aquí, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las imágenes adjuntas. Con referencia específica ahora a los dibujos en forma detallada, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para los fines de una discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

- 50 Las Figs. 1A-B ilustran que la sobreexpresión ectópica de HER2 libera monocapas de células mamarias de la

5 saturación del crecimiento y de la dependencia de los factores de crecimiento. (1A) Las monocapas de células MCF10A que expresan establemente el plásmido IRES-GFP (MCF10A) o HER2-IRES-EGFP (MCF10A-HER2) se privaron de alimento durante 24 horas y se estimularon con EGF (20 ng/mL) durante los intervalos de tiempo indicados. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis y se inmunotransfirieron (IB) con los anticuerpos indicados. (1B) Las células MCF10A y MCF10A-HER2 se desarrollaron durante hasta 8 días en presencia o ausencia de EGF o NRG-1 $\beta$  (cada uno a razón de 20 ng/mL). El crecimiento celular se controló usando el ensayo MTT. Los datos representan promedios  $\pm$  S.D. de triplicados. El experimento se repitió tres veces.

10 Las Figs. 2A-F ilustran que HER2 induce transcripcionalmente múltiples componentes de la ruta Notch. (2A) Los mapas de calor de expresión de los genes de la ruta Notch, cuyos niveles de expresión, tal como se determina usando chips de oligonucleótidos, difieren entre esferoides de células MCF10A y MCF10A-HER2 sembradas en Matrigel<sup>MR</sup> (día 0) y se cultivaron durante los intervalos de tiempo indicados. La barra de color representa los niveles de expresión relativa. (2B) Se usó PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para la validación de perfiles de expresión de chips de genes de rutas de Notch seleccionados en esferoides MCF10A y MCF10A-HER2 sembrados en el día 0 y cultivados en Matrigel<sup>MR</sup> durante los intervalos de tiempo indicados. (2C) análisis mediante qRT-PCR de genes de la ruta Notch seleccionados en esferoides MCF10A-HER2 incubados durante hasta cinco días en ausencia o presencia del inhibidor de MEK U0126 (1  $\mu$ M). (2D) Fotomicrografías confocales que muestran esferoides MCF10A y MCF10A-HER2 que expresan GFP inmunoteñidos por Laminina V (paneles izquierdos), o por Notch3 (paneles derechos), ocho días después de sembrar células individuales en Matrigel<sup>MR</sup>. Barras de escala, 50  $\mu$ m. (2E) Las monocapas de células MCF10A y MCF10A-HER2 se privaron de alimento durante 12 horas y se estimularon con EGF (20 ng/mL) durante los intervalos de tiempo indicados. Los lisados celulares se inmunotransfirieron con los anticuerpos indicados. NICD, dominio intracelular de Notch. (2F) Se cultivaron monocapas de células MCF10A y MCF10A-HER2 en medio sin suero, se inmunotñieron para Notch3 (rojo) y se contratiñeron los núcleos con DAPI (azul). El recuadro (rectángulo de líneas discontinuas, ampliado en el panel derecho) muestra la localización nuclear de Notch3, que probablemente representa el dominio intracelular escindido. Barra de escala, 20 $\mu$ m.

25 Las Figs. 3A-D ilustran que la mejora de la supervivencia y la proliferación de células que sobreexpresan HER2 son activadas por Notch3. (3A) Se inmunotransfirieron extractos de monocapas de células MCF10A y células MCF10A-HER2 que expresan establemente ARNph de control o ARNph dirigido a Notch3 con los anticuerpos indicados. (3B) La proliferación de células MCF10A y MCF10A-HER2 en monocapa que expresan de manera estable los ARNph indicados se determinó usando el ensayo de MTT. Se presentan los valores promedio y de desviación estándar (barras) de triplicados. (3C) Las células MCF10A y MCF10A-HER2 que expresan de manera estable los ARNph indicados se cultivaron durante 8 días en pozos recubiertos con poliHEMA y se fotografiaron utilizando un microscopio de contraste de fases (parte superior, barra de escala, 100  $\mu$ m). El número de esferoides por pozo se determinó por triplicado y se presentan las desviaciones (barras) promedio y estándar (panel inferior izquierdo). Para las células MCF10A-HER2, se estima el volumen de 120 esferoides por condición y se presenta el volumen promedio y los errores estándar (barras). (3D) Se cultivaron células MCF10A y células MCF10-HER2 que expresan establemente ARNph de control o ARNph dirigidos a Notch3 en Matrigel<sup>MR</sup> durante los intervalos de tiempo indicados y las imágenes capturadas mediante microscopía confocal. La fila superior muestra inmunotinción para Caspasa 3 escindida (activa) (barra de escala, 25  $\mu$ m), mientras que los paneles inferiores presentan la anatomía de los esferoides que expresan GFP (barra de escala, 50  $\mu$ m). El gráfico de barras presenta las fracciones promedio ( $\pm$  S.D., barras) de los esferoides llenos de lumen, según se determina analizando 100 esferoides de cada grupo.

45 Las Figs. 4A-G ilustran que Notch3 promueve la supervivencia de células mamarias que sobreexpresan HER2. (4A) Los niveles de expresión relativa de transcripciones correspondientes a c-Myc y ciclina D1 (CCND1) se determinaron aplicando PCR cuantitativa en tiempo real a muestras de ARN de esferoides de MCF10A y MCF10A-HER2. (4B) Las células MCF10A y MCF10A-HER2 se cultivaron en Matrigel<sup>MR</sup> durante 4 días y luego los esferoides resultantes se incubaron en presencia de Trastuzumab (10  $\mu$ g/mL) y/o un inhibidor de gamma-secretasa (GSI, 1  $\mu$ M). Dos días después, las células se extrajeron y se sometieron a inmunotransferencia, tal como se indica. (4C) Se lisaron monocapas de células MCF10A-HER2 transducidas de forma estable con ARNph de control o de Notch3 y se inmunotransfirieron para c-Myc y Cyclin D1. (4D) Se transfectaron monocapas de células MDA-MB231 y MCF10A con pCDNA3.1-Notch3-NICD o con un plásmido vacío, se lisaron 48 horas después y se inmunotransfirieron usando los anticuerpos indicados. (4E) Se cultivaron células BT474 y MCF10A-HER2 en monocapas y se transfectaron con oligonucleótidos de ARNpi de control o específicos de HES1, seguido de lisis 48 horas después y de inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. (4F) Los esferoides de MCF10-HER2 se cultivaron en Matrigel<sup>MR</sup> durante 4 días y luego se incubaron con Trastuzumab y/o GSI durante hasta 4 días adicionales. Las microfotografías confocales muestran la morfología acinar de las células que expresan GFP, junto con la tinción para la forma escindida de Caspasa 3 en los paneles superiores. Barras de escala, 50  $\mu$ m. La fracción de esferoides llenos de lumen en el día 8 se cuantificó contando 100 esferoides en cada grupo de tratamiento. Los datos denotan promedios ( $\pm$  S.D.) de triplicados. (4G) Se cultivaron células MCF10-HER2 en Matrigel<sup>MR</sup> durante 4 días, y luego se incubaron durante hasta 4 días adicionales en presencia de inhibidores de c-Myc (10058-F4; 1  $\mu$ M), PI3K (LY-294002; 2  $\mu$ M) o MEK (U0126; 1  $\mu$ M). Los paneles superiores muestran imágenes confocales de esferoides capturados el día 6 después de la inmunotinción para Caspasa 3 escindida (rojo) y contratiñición con DAPI (azul). Los paneles inferiores muestran estructuras formadas por células que expresan GFP el día 8. Barras de escala, 50  $\mu$ m. Las fracciones de esferoides llenas se determinaron como en la Figura 4F.

60 Las FIGs. 5A-C ilustran que la expresión de Notch3 se correlaciona con los niveles de HER2 en tumores mamarios

humanos y en un modelo animal que sobreexpresa HER2. (5A) Análisis inmunohistoquímico de la expresión de HER2 y Notch3 en glándulas mamarias de ratones normales, así como en regiones de hiperplasia de ratones MMTV-HER2. Barra de escala, 200  $\mu\text{m}$ . (5B) Se analizaron los lisados de muestras de cáncer de mama invasivo utilizando matrices de proteínas de fase inversa (RPPA) para la expresión de Notch3, junto con los niveles de formas totales y fosforiladas de EGFR, HER2 y ER. Se emplearon dos cohortes de pacientes independientes: Cohorte 1: mapa de calor izquierdo, n = 102 pacientes; (Speers et al, 2009) y Cohorte 2: mapa de calor derecho, n = 95 pacientes. Los mapas de calor muestran matrices de correlación de la expresión de la proteína y el esquema de color corresponde a los coeficientes de correlación de Pearson (r). Nótese una alta correlación entre Notch3 y la forma fosforilada de HER2 (p1248) en ambas cohortes ( $r = 0,43$ ,  $p = 1,55\text{E}-05$  para la cohorte izquierda, y  $r = 0,23$ ,  $p = 2,58\text{E}-02$  para la cohorte derecha). (5C) Presentación esquemática de los efectos de HER2 en la ruta Notch, que se refiere específicamente a los componentes sobre regulados (flechas verticales rojas) en células MCF10A que sobreexpresan HER2. NICD, dominio intracelular de Notch.

### Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente divulgación, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a un método para tratar el carcinoma ductal *in situ* (DCIS).

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificada por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras.

Una gran fracción de carcinoma ductal *in situ* (DCIS), una lesión precursora no invasiva de cáncer de mama invasivo, sobreexpresa el oncogén *HER2/neu*. Los conductos de DCIS están anormalmente llenos de células que evaden la apoptosis. Con el fin de comprender los mecanismos subyacentes detrás de este fenómeno, los presentes inventores sobreexpresaron HER2 en células epiteliales mamarias y observaron proliferación independiente del factor de crecimiento. Cuando crecieron en matriz extracelular como esferoides tridimensionales, las células de control desarrollaron un lumen hueco, pero las células que sobreexpresan HER2 poblaron el lumen evadiendo la apoptosis. Se ha demostrado que la sobreexpresión de HER2 en este modelo celular de DCIS conduce a una regulación transcripcional al alza de múltiples componentes de la ruta de supervivencia de Notch. De manera importante, el llenado luminal requirió una regulación al alza de una ruta de señalización que comprende Notch3, su dominio intracelular escindido (NICD) y el regulador transcripcional HES1, dando como resultado niveles elevados de c-Myc y ciclina D1. En línea con la colaboración HER2-Notch3, los fármacos que interceptan cualquiera de los brazos revirtieron el fenotipo tipo DCIS. Por lo tanto, los presentes inventores proponen una terapia de combinación dirigida tanto a HER2 como a Notch para retrasar la transición putativa de DCIS a carcinoma ductal infiltrante que sobreexpresa la oncoproteína HER2.

Además, los presentes inventores encontraron una asociación entre los niveles de HER2 y los niveles de expresión de los componentes de la ruta Notch en muestras tumorales de pacientes con cáncer de mama. Por lo tanto, los presentes inventores proponen que el análisis de la expresión de HER2 y los componentes de la ruta NOTCH en una muestra de células de mama puede servir como una ayuda para el diagnóstico y/o clasificación de tales cánceres.

Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una combinación de un inhibidor de gamma secretasa y un anticuerpo capaz de unirse y regular a la baja una actividad de HER2 para su uso en el tratamiento de una lesión de carcinoma ductal *in situ* (DCIS). Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada que incluyen, pero no se limitan a, maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras conocidas, medios, técnicas y procedimientos por parte de profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Como se usa en este documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

El término "lesión de DCIS" denota una lesión mamaria que está contenida dentro de los conductos lácteos de la mama. Las lesiones de DCIS contienen algunas células con características malignas, pero no todas estas lesiones se comportan como cáncer, por ejemplo, no se propagarán fuera de los conductos ni invadirán el tejido mamario circundante, ni amenazarán la vida. DCIS ha sido descrito como un precursor no obligado de cáncer de mama y como cáncer no invasivo.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un sujeto mamífero, preferiblemente un ser humano.

La frase "componente que participa en la ruta NOTCH" se refiere a un polipéptido o polinucleótido implicado en la ruta de señalización de NOTCH. Los componentes a modo de ejemplo se describen a continuación en la presente memoria.

La ruta de señalización de Notch es un mecanismo de señalización intercelular conservado.

Los miembros de la familia de genes Notch (NOTCH) codifican receptores transmembrana que son críticos para diversas decisiones de destinos celulares. Se han identificado múltiples ligandos que activan a Notch y receptores relacionados, incluidos Serrate y Delta en *Drosophila* y JAG1 (MIM.601920) en vertebrados.

5 Se han caracterizado cuatro receptores Notch diferentes (NOTCH: NOTCH1 a NOTCH4) y cinco ligandos (Jagged-1 (JAG1) y Jagged-2 (JAG2) y tipo Delta [DLL]: DLL1, DLL2 y DLL4) en células de mamífero. Estos receptores transmembrana y ligandos se expresan en diferentes combinaciones en la mayoría, si no en todos, los tipos de células. La ruta Notch regula la determinación del destino celular de las células vecinas a través de la inhibición lateral, dependiendo de su capacidad para expresar los receptores o los ligandos.

10 Después de la unión del ligando, los NOTCH se activan mediante una serie de escisiones que liberan su dominio intracelular (NICD). Este procesamiento requiere la actividad de dos proteasas, a saber, ADAM17 (enzima convertidora del factor- $\alpha$  de necrosis tumoral o TACE MIM.603369) y presenilina 1 (PSEN1 MIM.104311), que también entran dentro de la categoría de un componente de una ruta NOTCH.

15 La translocación nuclear de NICD da como resultado la activación transcripcional de genes de la familia HES (familia Hes/E (spl)) y la familia HEY (familia Hesr/Hey) a través de la interacción de NICD con RBPSUH (o CBF1 MIM.147183), Su (H) y Lag-1, que también se conoce como la proteína de unión a la secuencia señal de recombinación (RBP)-j (también llamada Supresor de Hairless, Su(H)), cada una de estas que cae también dentro de la categoría de un componente de la ruta NOTCH.

20 En general, cuando se activa, la señalización de Notch permite que las células vecinas adquieran fenotipos distintos, a través de un proceso llamado inhibición lateral. El receptor de Notch se escinde previamente en el aparato de Golgi y se dirige posteriormente a la membrana plasmática, donde interactúa con los ligandos localizados en las células vecinas. La interacción receptor-ligando da como resultado un cambio conformacional en el receptor, permitiendo de este modo escisiones adicionales mediante TACE y el complejo  $\gamma$ -secretasa. Esta actividad proteolítica permite que el dominio intracelular de Notch (NICD) se transloque al núcleo donde activa la transcripción de genes diana (por ejemplo, la familia HES y HRP de represores transcripcionales).

25 La monoubiquitilación (Ub) del ligando por mindbomb (MIB) induce endocitosis del ligando y el dominio extracelular de Notch (NECD) en las células del ligando donde podría iniciarse la señalización adicional.

30 Los receptores de Notch experimentan un conjunto complejo de eventos de procesamiento proteolítico en respuesta a la activación del ligando, que finalmente conduce a la liberación del dominio intracelular del receptor. La transducción de señal normalmente se inicia al unirse a ligandos transmembrana de la clase Serrate o Delta, que induce la liberación proteolítica del dominio NOTCH intracelular (NICD).

NICD libre se transloca al núcleo para formar un complejo de corta duración con un factor de transcripción tipo Rel, CSL y activadores y coactivadores tipo Mastermind que activan programas de expresión génica específicos de linaje.

35 Como se ha mencionado, la presente descripción contempla la regulación a la baja de cualquier componente de la ruta NOTCH que está regulada al alza en DCIS por encima de un umbral predeterminado.

40 Los métodos para analizar si un componente particular está regulado al alza en DCIS son conocidos en la técnica y pueden efectuarse a nivel del ARN (usando técnicas tales como análisis de transferencia Northern, RT-PCR y chips de oligonucleótidos) y/o a nivel de la proteína (usando técnicas tales como ELISA, análisis de transferencia Western, inmunohistoquímica y similares, que pueden efectuarse usando anticuerpos específicos del componente de la ruta NOTCH).

Según una realización, el componente de la ruta NOTCH (y HER2) está regulado al alza al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces y más preferiblemente al menos 3 veces en el DCIS en comparación con el tejido mamario de control normal.

45 De acuerdo con otra realización, el componente de la ruta NOTCH es *Hairy and Enhancer of Split 1* (HES1; NM\_005524, NP\_005515), NOTCH1 (NM\_017617, NP\_060087.3), NOTCH 2 (NM\_024408, NP\_077719.2) y NOTCH 3 (NM\_000435, NP\_000426.2).

De acuerdo con otra realización, el componente de la ruta NOTCH es *Hairy and Enhancer of Split 1* (HES1; NM\_005524, NP\_005515), NOTCH 2 (NM\_024408, NP\_077719.2) o NOTCH 3 (NM\_000435, NP\_000426.2).

50 De acuerdo con otra realización, el componente de vía NOTCH es *Hairy and Enhancer of Split 1* (HES1), NOTCH 2 y NOTCH 3, ADAM17 o Presenilina 1.

Como se ha mencionado, el método de este aspecto de la presente divulgación implica una combinación de regulación a la baja de un componente de la ruta NOTCH así como regulación a la baja de una actividad y/o expresión de HER2.

Como se usa en la presente memoria, "HER2" se refiere a un receptor tirosina quinasa (RTK) de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, E.C. 2.7.10.1 también denominado ErbB-2, NEU y p185erbB-2.

5 La regulación a la baja de los componentes de la ruta NOTCH y HER2 puede efectuarse a nivel genómico y/o del transcrito usando una variedad de moléculas que interfieren con la transcripción y/o traducción (por ejemplo, agentes silenciadores de ARN, ribozima, ADNzima y antisentido) o a nivel de la proteína usando, por ejemplo, antagonistas, enzimas que escinden al polipéptido y similares.

De acuerdo con una realización, los agentes usados para regular a la baja los componentes de la ruta NOTCH y/o HER2 son anticuerpos.

10 Los anticuerpos anti-HER2 de la presente invención pueden seleccionarse a partir de anticuerpos preexistentes (por ejemplo, hibridomas disponibles públicamente o bibliotecas de anticuerpos recombinantes, descritos adicionalmente a continuación) o a partir de anticuerpos generados recientemente producidos de acuerdo con métodos que son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente a continuación.

Los anticuerpos y los métodos para generarlos se describen detalladamente en las siguientes secciones.

15 El término "anticuerpo" como se usa en esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen de la siguiente manera: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo, puede producirse por digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')<sub>2</sub>, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')<sub>2</sub> es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y (5) Anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, enlazadas mediante un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente.

20 Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de los mismos, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988e).

25 Los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos están descritos, por ejemplo, por Goldenberg, Patentes estadounidenses Nos. 4.036.945 y 4.331.647, y las referencias contenidas en ellas. Véase también Porter, R. R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)]. También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

30 Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar et al., [*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69: 2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzadas por productos químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena polipeptídica con un péptido enlazador que puentea los dos dominios V. Los métodos para producir sFv se describen, por ejemplo, por [Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988), Pack et al., *Bio/Technology* 11: 1271-77 (1993) y la Patente estadounidense No. 4.946.778.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica para una sola región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR ("unidades de reconocimiento mínimo") pueden obtenerse

construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de las células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)].

5 Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígenos de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos que forman una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor están reemplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador) tales como ratón, rata o conejo  
10 que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana están reemplazados por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR  
15 corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

20 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos importados, que normalmente se toman de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-327 (1988);  
25 Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR de roedor o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente estadounidense No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y  
30 posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al., y Boerner et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)]. De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la que se observa en humanos en todos los aspectos, incluida la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

45 Como se usa en este documento, el término "epítipo" se refiere a cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el parátipo de un anticuerpo.

Los determinantes epitópicos habitualmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de carbohidrato y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

50 Los métodos para identificar los epítipos de unión de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Brevemente, los epítipos de unión a anticuerpo se pueden determinar mediante un ensayo de desplazamiento de anticuerpo. Esto puede proporcionar una comprensión inicial del sitio de unión. Las técnicas de desplazamiento de anticuerpos son bien conocidas en materia. A veces se requiere un análisis más fino, para este fin se emplean técnicas de mapeo de epítipos. En este caso, se emplea típicamente el método de escaneo de péptidos por Reineke et al., 1999 (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 243: 23-36).

De acuerdo con una realización, el anticuerpo que reconoce HER2 se une al sitio de dimerización de HER2 (es decir, la unión del anticuerpo al mismo es suficiente para bloquear la dimerización de HER2). Ejemplos de tales anticuerpos se proporcionan en el documento WO2010/029534.

De acuerdo con otra realización, el anticuerpo que reconoce HER2 es Herceptin®/Trastuzumab.

- Preferiblemente, los anticuerpos contemplados por la presente invención se unen a sus objetivos respectivos con una afinidad mínima de al menos 1  $\mu$ M, 200 nM, 100 nM, 1 nM o más. De acuerdo con la presente divulgación, la regulación a la baja de HER2 y/o un componente de la ruta NOTCH también se puede lograr mediante silenciamiento del ARN. Como se usa en este documento, la frase "silenciamiento de ARN" se refiere a un grupo de
- 5 mecanismos reguladores [por ejemplo, ARN de interferencia (ARNi), silenciamiento génico transcripcional (TGS), silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), represión, cosupresión y represión traduccional] mediado por moléculas de ARN que resultan en la inhibición o "silenciamiento" de la expresión de un correspondiente gen codificante de proteínas. Se ha observado silenciamiento de ARN en muchos tipos de organismos, incluyendo plantas, animales y hongos.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "agente de silenciamiento de ARN" se refiere a un ARN que es capaz de inhibir específicamente o "silenciar" la expresión de un gen diana. En ciertas realizaciones, el agente silenciador de ARN es capaz de evitar el procesamiento completo (por ejemplo, la traducción y/o expresión completa) de una molécula de ARNm a través de un mecanismo de silenciamiento postranscripcional. Los agentes silenciadores de ARN incluyen moléculas de ARN no codificantes, por ejemplo, dúplex de ARN que comprenden
- 15 cadenas apareadas, así como ARN precursores a partir de los cuales pueden generarse tales ARN pequeños no codificantes. Los ejemplos de agentes silenciadores de ARN incluyen ARN de doble cadena tales como ARNpi, miARN y ARNph. En una realización, el agente silenciador de ARN es capaz de inducir interferencia de ARN. En otra realización, el agente silenciador de ARN es capaz de mediar la represión traduccional.
- 20 De acuerdo con una realización de la divulgación, el agente silenciador de ARN es específico del ARN diana (por ejemplo, HER2 y/o un componente de la ruta NOTCH) y no inhibe o silencia en forma cruzada un gen o una variante de empalme que exhibe 99% o menos de homología global con el gen diana, por ejemplo, menos del 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81% de homología global con el gen diana.
- 25 La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN pequeños de interferencia (ARNpi). El proceso correspondiente en las plantas se conoce comúnmente como silenciamiento génico postranscripcional o silenciamiento de ARN y también se denomina como represión en hongos. Se cree que el proceso de silenciamiento génico postranscripcional es un mecanismo de defensa celular conservado evolutivamente, que se usa para prevenir la expresión de genes foráneos y que comúnmente comparten diversas especies de flora y phyla. Dicha protección de la expresión génica foránea puede
- 30 haber evolucionado en respuesta a la producción de ARN de doble cadena (ARNdc) derivados de infección viral o de la integración aleatoria de elementos transposón en un genoma huésped a través de una respuesta celular que destruye específicamente ARN homólogo de cadena sencilla o ARN genómico viral.
- La presencia de ARNdc largos en células estimula la actividad de una enzima ribonucleasa III denominada Dicer. Dicer está involucrada en el procesamiento del ARNdc en trozos cortos de ARNdc conocidos como ARN pequeños de interferencia (ARNpi). Los ARN pequeños de interferencia derivados de la actividad Dicer son típicamente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y comprenden dúplex de aproximadamente 19 pares de bases. La respuesta de ARNi también presenta un complejo de endonucleasa, comúnmente denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media en la escisión del ARN de cadena sencilla que
- 35 tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNpi. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNpi.
- De acuerdo con esto, algunas realizaciones de la divulgación contemplan el uso de ARNdc para regular a la baja la expresión de proteína de ARN.
- 40 De acuerdo con una realización, el ARNdc tiene más de 30 pb. El uso de ARNdc largos (es decir, ARNdc de más de 30 pb) ha sido muy limitado debido a la creencia de que estas regiones más largas de ARN de doble cadena darán como resultado la inducción del interferón y la respuesta de PKR. Sin embargo, el uso de ARNdc largos puede proporcionar numerosas ventajas en cuanto a que la célula puede seleccionar la secuencia de silenciamiento óptima que alivia la necesidad de probar numerosos ARNpi; los ARNdc largos permitirán silenciar bibliotecas para que tengan menos complejidad de la que sería necesaria para los ARNpi; y, quizás lo más importante, el ARNdc largo podría evitar mutaciones de escape viral cuando se usa como compuesto terapéutico.
- 45 Varios estudios demuestran que los ARNdc largos pueden usarse para silenciar la expresión génica sin inducir la respuesta al estrés o causar efectos significativos fuera del objetivo; véase, por ejemplo [Strat et al., *Nucleic Acids Research*, 2006, vol. 34, No. 13 3803-3810; Bhargava A et al., *Brain Res. Protoc.* 2004; 13: 115-125; Diallo M., et al., *Oligonucleotides*. 2003; 13: 381-392; Paddison P.J., et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 1443- 448; Tran N., et al., *FEBS Lett.* 2004; 573: 127-134].
- 50 En particular, la divulgación de acuerdo con algunas realizaciones de la misma contempla la introducción de ARNdc largo (más de 30 transcritos de bases) para el silenciamiento génico en células en la que la ruta del interferón no está activada (por ejemplo, células embrionarias y ovocitos) véase, por ejemplo, Billy et al., *PNAS* 2001, Vol 98, páginas 14428-14433, y Diallo et al., *Oligonucleotides*, octubre 1 de 2003, 13 (5): 381-392. Doi: 10.1089/154545703322617069.

La divulgación de acuerdo con algunas realizaciones de la misma también contempla la introducción de ARNdc largo específicamente diseñado para no inducir las rutas de interferón y PKR para la regulación a la baja de la expresión génica. Por ejemplo, Shinagwa e Ishii [Genes & Dev. 17 (11): 1340-1345, 2003] han desarrollado un vector, denominado pDECAP, para expresar ARN largo de doble cadena a partir de un promotor de ARN polimerasa II (Pol II). Debido a que los transcritos de pDECAP carecen tanto de la estructura de 5'-cap como de la cola de 3'-poli (A) que facilitan la exportación de ARNdc al citoplasma, el ARNdc largo de pDECAP no induce la respuesta al interferón.

Otro método para evadir las rutas de interferón y PKR en sistemas de mamíferos es mediante la introducción de ARN pequeños inhibidores (ARNpi), ya sea mediante transfección o expresión endógena.

El término "ARNpi" se refiere a dúplex de ARN pequeño inhibidor (generalmente entre 18-30 pares de bases) que inducen la ruta de interferencia de ARN (ARNi). Típicamente, los ARNpi se sintetizan químicamente como 21meros con una región dúplex central de 19 pb y salientes simétricas 3' de 2 bases en los terminales, aunque se ha descrito recientemente que los dúplex de ARN químicamente sintetizados de 25-30 bases de longitud pueden tener tanto como 100 veces más potencia comparado con 21meros en la misma ubicación. La mayor potencia observada obtenida usando ARN más largos en la activación de ARNi se predice como resultado de proporcionar Dicer con un sustrato (27mero) en lugar de un producto (21mero) y que esto mejora la velocidad o eficiencia de entrada del dúplex de ARNpi en RISC.

Se ha encontrado que la posición del saliente 3' influye en la potencia de un ARNpi y los dúplex asimétricos que tienen una saliente 3' en la cadena antisentido son generalmente más potentes que aquellos con la saliente 3' en la cadena sentido (Rose et al., 2005). Esto puede atribuirse a la carga de cadena asimétrica en RISC, ya que se observan los patrones de eficacia opuestos cuando se dirige al transcrito antisentido.

Las cadenas de un ARN de interferencia de doble cadena (por ejemplo, un ARNpi) pueden estar conectadas para formar una estructura de horquilla o bucle de tallo (por ejemplo, un ARNph). Por lo tanto, como se mencionó, el agente silenciador de ARN de algunas realizaciones de la invención también puede ser un ARN pequeño de horquilla (ARNph).

El término "ARNph", como se usa en este documento, se refiere a un agente de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y una segunda región de secuencia complementaria, siendo suficiente el grado de complementariedad y orientación de las regiones tal que el emparejamiento de bases se produce entre las regiones, estando unidas las regiones primera y segunda por una región de bucle, resultando el bucle de una falta de emparejamiento de bases entre nucleótidos (o análogos de nucleótidos) dentro de la región bucle. El número de nucleótidos en el bucle es un número entre, y que incluye, 3 a 23, o 5 a 15, o 7 a 13, o 4 a 9, o 9 a 11. Algunos de los nucleótidos en el bucle pueden estar implicados en interacciones de pares de bases con otros nucleótidos en el bucle. Los ejemplos de secuencias de oligonucleótidos que pueden usarse para formar el bucle incluyen 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, TR et al., (2002) Science 296: 550) y 5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. et al., (2002) RNA 8: 1454). Un experto en la materia reconocerá que el oligonucleótido de cadena sencilla resultante forma una estructura de tallo-bucle u horquilla que comprende una región de doble cadena capaz de interactuar con la maquinaria de ARNi.

De acuerdo con una realización específica, el agente es un ARNpi dirigido contra HES1.

De acuerdo con otra realización, el agente silenciador de ARN puede ser un miARN. Los miARN son pequeños ARN hechos de genes que codifican transcritos primarios de diversos tamaños. Han sido identificados tanto en animales como en plantas. El transcrito primario (denominado "miARN pri") se procesa a través de varias etapas nucleolíticas hasta un miARN precursor más corto, o "miARN pre". El miARN pre está presente en una forma plegada de manera que el miARN final (maduro) está presente en un dúplex, siendo denominadas las dos cadenas como el miARN (la cadena que eventualmente emparejará bases con el objetivo). El miARN pre es un sustrato para una forma de dicer que elimina el dúplex de miARN del precursor, después de lo cual, de forma similar a los ARNpi, el dúplex puede tomarse en el complejo RISC. Se ha demostrado que los miARN pueden ser transgénicamente expresados y ser eficaces mediante la expresión de una forma precursora, en lugar de la forma primaria completa (Parizotto et al., (2004) Genes & Development 18: 2237-2242 y Guo et al., (2005) Plant Cell 17: 1376-1386).

A diferencia de los ARNpi, los miARN se unen a las secuencias de transcritos con solo una complementariedad parcial (Zeng et al., 2002, Molec., Cell 9: 1327-1333) y reprimen la traducción sin afectar los niveles de ARN en estado estable (Lee et al., 1993, Cell 75: 843-854; Wightman et al., 1993, Cell 75: 855-862). Tanto los miARN como los ARNpi son procesados por Dicer y se asocian con componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (Hutvagner et al., 2001, Science 293: 834-838; Grishok et al., 2001, Cell 106: 23-34; Ketting et al., 2001, Genes Dev. 15: 2654-2659; Williams et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 6889-6894; Hammond et al., 2001, Science 293: 1146-1150; Moulatos et al., 2002, Genes Dev. 16: 720-728). Un informe reciente (Hutvagner et al., 2002, Scienceexpress 297: 2056-2060) plantea la hipótesis de que la regulación génica a través de la ruta de miARN frente a la ruta de ARNpi está determinada únicamente por el grado de complementariedad con el transcrito diana. Se especula que los ARNpi con solo una identidad parcial con el ARNm diana funcionarán en la represión traduccional, en forma similar a un miARN, en lugar de desencadenar la degradación del ARN.

La síntesis de agentes de silenciamiento de ARN adecuados para uso con algunas realizaciones de la divulgación se puede efectuar de la siguiente manera. En primer lugar, la secuencia de ARNm seleccionada se explora secuencia abajo del codón de inicio AUG para las secuencias de dinucleótidos de AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes a 3' se registra como posibles sitios diana de ARNpi. Preferiblemente, los sitios diana de ARNpi se seleccionan del marco de lectura abierto, ya que las regiones no traducidas (UTR) son más ricas en los sitios de unión a proteínas reguladoras. Las proteínas de unión a UTR y/o los complejos de inicio de la traducción pueden interferir con la unión del complejo de ARNpi endonucleasa [Tuschl ChemBiochem. 2: 239-245]. Sin embargo, se apreciará que los ARNpi dirigidos a regiones no traducidas también pueden ser efectivos, como se demostró para GAPDH, en donde el ARNpi dirigido a la UTR 5' mediaba aproximadamente un 90% de disminución en el ARNm de GAPDH celular y suprimía completamente el nivel de proteína ([www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html](http://www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)).

En segundo lugar, los sitios diana potenciales se comparan con una base de datos genómica apropiada (por ejemplo, de ser humano, ratón, rata, etc.) usando cualquier software de alineamiento de secuencias, tal como el software BLAST disponible a través del servidor del NCBI ([worldwidewebdotncbidotnlmcolnidotgov/BLAST/](http://worldwidewebdotncbidotnlmcolnidotgov/BLAST/)). Los sitios diana putativos que exhiben una homología significativa con otras secuencias codificantes se filtran.

Las secuencias diana que califican se seleccionan como plantilla para la síntesis de ARNpi. Las secuencias preferidas son aquellas que incluyen un bajo contenido de G/C ya que éstas han demostrado ser más eficaces en la mediación del silenciamiento génico en comparación con aquellas con un contenido de G/C superior al 55%. Varios sitios diana se seleccionan preferiblemente a lo largo de la longitud del gen diana para evaluación. Para una mejor evaluación de los ARNpi seleccionados, se usa preferiblemente conjuntamente un control negativo. El ARNpi de control negativo preferiblemente incluye la misma composición de nucleótidos que los ARNpi pero carecen de una homología significativa con el genoma. Por lo tanto, preferiblemente se usa una secuencia de nucleótidos codificados del ARNpi, con la condición de que no muestre ninguna homología significativa con ningún otro gen.

Se apreciará que el agente de silenciamiento de ARN de algunas realizaciones de la divulgación no necesita estar limitado a aquellas moléculas que contienen solo ARN, sino que abarca además nucleótidos y no nucleótidos químicamente modificados.

En algunas realizaciones, el agente de silenciamiento de ARN proporcionado en la presente memoria puede asociarse funcionalmente con un péptido que penetra en la célula. Tal como se usa en la presente memoria, un "péptido que penetra en la célula" es un péptido que comprende una secuencia corta de aminoácidos (aproximadamente 12-30 restos) o un motivo funcional que confiere las propiedades de translocación independientes de la energía (es decir, no endocíticas) asociadas con el transporte del complejo permeable a la membrana a través del plasma y/o las membranas nucleares de una célula. El péptido que penetra en la célula utilizado en el complejo permeable de membrana de algunas realizaciones de la invención preferiblemente comprende al menos un resto de cisteína no funcional, que es libre o forma derivado para formar un enlace disulfuro con un ácido ribonucleico de doble cadena que ha sido modificado para tal enlace. Los motivos de aminoácidos representativos que confieren tales propiedades se enumeran en la patente estadounidense No. 6.348.185. Los péptidos que penetran en la célula de algunas realizaciones de la invención incluyen preferiblemente, pero no se limitan a, penetratina, transportina, pls1, TAT (48-60), pVEC, MTS y MAP.

Otro agente capaz de regular a la baja HER2 y/o un miembro de la ruta NOTCH es una molécula de ADNzima capaz de escindir específicamente un transcrito de ARNm o secuencia de ADN del HER2 y/o un miembro de la ruta NOTCH. Las ADNzimas son polinucleótidos de cadena sencilla que son capaces de escindir tanto secuencias diana sencillas como dobles (Breaker, RR y Joyce, G. Chemistry and Biology 1995; 2: 655; Santoro, SW & Joyce, GF Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 943: 4262). Se ha propuesto un modelo general (el modelo "10-23") para la ADNzima. Las ADNzimas "10-23" tienen un dominio catalítico de 15 desoxirribonucleótidos, flanqueado por dos dominios de reconocimiento de sustrato de siete a nueve desoxirribonucleótidos cada uno. Este tipo de ADNzima puede escindir eficazmente su sustrato ARN en uniones de purina:pirimidina (Santoro, SW & Joyce, GF Proc. Natl. Acad. Sci. USA 199; para revisión de ADNzimas, véase Khachigian, LM [Curr Opin Mol Ther 4: 119-21 (2002)]).

Se han divulgado ejemplos de construcción y amplificación de ADNzimas sintéticas modificadas genéticamente que reconocen sitios de escisión diana de cadena sencilla y doble en la patente estadounidense No. 6.326.174 de Joyce et al. Se ha observado recientemente que las ADNzimas de diseño similar dirigidas contra el receptor humano de Uroquinasa inhiben la expresión del receptor de Uroquinasa e inhiben con éxito la metástasis de células de cáncer de colon *in vivo* (Itoh et al., 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther [www.asgt.org](http://www.asgt.org)). En otra aplicación, las ADNzimas complementarias a los oncogenes bcr-ab1 tuvieron éxito en la inhibición de la expresión de oncogenes en células de leucemia y en la disminución de las tasas de recaída en el trasplante de médula ósea autóloga en casos de CML y ALL.

La regulación a la baja de HER2 y/o un miembro de la ruta NOTCH también puede efectuarse usando un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de ARNm que codifica HER2 y/o el miembro de la ruta NOTCH.

Otro agente capaz de regular a la baja HER2 y/o un miembro de la ruta NOTCH es una molécula de ribozima capaz

de escindir específicamente un transcrito de ARNm que codifica HER2 y/o al miembro de la ruta NOTCH.

Las ribozimas se usan cada vez más para la inhibición específica de secuencia de la expresión génica mediante la escisión de los ARNm que codifican proteínas de interés [Welch et al., *Curr Opin Biotechnol.* 9: 486-96 (1998)]. La posibilidad de diseñar ribozimas para escindir cualquier ARN diana específico los ha convertido en valiosas herramientas tanto en investigación básica como en aplicaciones terapéuticas.

Un método adicional para regular la expresión de HER2 y/o el miembro de la ruta NOTCH en las células es a través de oligonucleótidos que forman triplex (TFO). Estudios recientes han demostrado que se pueden diseñar TFO que puedan reconocer y unirse a las regiones de polipurina/polipirimidina en el ADN helicoidal de cadena doble en una forma específica de la secuencia. Estas reglas de reconocimiento están resumidas por Maher III, L.J. et al., *Science*, 1989; 245: 725-730; Moser, H.E., et al., *Science*, 1987; 238: 645-630; Beal, P.A., et al., *Science*, 1992; 251: 1360-1363; Cooney, M., et al., *Science*, 1988; 241: 456-459; y Hogan, M. E., et al., publicación EP 375408. La modificación de los oligonucleótidos, tal como la introducción de intercaladores y sustituciones en la cadena principal, y optimización de las condiciones de unión (pH y concentración de cationes) han ayudado a superar obstáculos inherentes a la actividad de TFO, como la repulsión e inestabilidad de la carga, y recientemente se demostró que los oligonucleótidos sintéticos pueden ser dirigidos a secuencias específicas (para una revisión reciente véase Seidman y Glazer, *J Clin Invest* 2003; 112: 487-94).

En general, el oligonucleótido que forma triplex tiene la correspondencia de secuencia:

oligo	3'--A	G	G	T
dúplex	5'--A	G	C	T
dúplex	3'--T	C	G	A

Sin embargo, se ha demostrado que los tripletes A-AT y G-GC tienen la mayor estabilidad de triple hélice (Reither y Jeltsch, *BMC Biochem*, 2002, 12 de septiembre, Epub). Los mismos autores han demostrado que los TFO diseñados de acuerdo con la regla A-AT y G-GC no forman triplex no específicos, lo que indica que la formación de triplex es en realidad específica de la secuencia.

Por lo tanto, para cualquier secuencia dada en HER2 y/o el componente de la región reguladora de la ruta NOTCH, se puede idear una secuencia de formación de triplex. Los oligonucleótidos formadores de triplex son preferiblemente al menos 15, más preferiblemente 25, aún más preferiblemente 30 o más nucleótidos de longitud, hasta 50 o 100 pb.

La transfección de células (por ejemplo, a través de liposomas catiónicos) con TFO, y la formación de la estructura de triple hélice con el ADN diana induce cambios estéricos y funcionales, bloqueando el inicio y elongación de la transcripción, permitiendo la introducción de cambios de secuencia deseados en el ADN endógeno y que resulta en la regulación a la baja específica de la expresión del gen. Los ejemplos de tal supresión de la expresión del gen en células tratadas con TFO incluyen desactivación de los genes supFG1 episomal y HPRT endógeno en células de mamífero (Vásquez et al., *Nucl Acids Res.* 1999; 27: 1176-81, y Puri, et al., *J Biol. Chem*, 2001; 276: 28991-98), y la regulación a la baja específica de secuencia y objetivo de la expresión del factor de transcripción Ets2, importante en la etiología del cáncer de próstata (Carbone, et al., *Nucl Acid Res.* 2003; 31: 833-43) y el gen proinflamatorio ICAM-1 (Besch et al., *J Biol Chem*, 2002; 277: 32473-79). Además, Vuyisich y Beal han demostrado recientemente que los TFO específicos de secuencia pueden unirse a ARNdc, inhibiendo la actividad de enzimas dependientes de ARNdc tales como quinasas dependientes de ARN (Vuyisich y Beal, *Nuc. Acids Res* 2000; 28: 2369-74).

Adicionalmente, los TFO diseñados de acuerdo con los principios anteriormente mencionados pueden inducir mutagénesis dirigida capaz de efectuar la reparación del ADN, proporcionando así tanto regulación a la baja como regulación al alza de la expresión de genes endógenos (Seidman y Glazer, *J Clin Invest* 2003; 112: 487-94). La descripción detallada del diseño, síntesis y administración de TFO efectivos se puede encontrar en las solicitudes de patente estadounidenses Nos. 2003 017068 y 2003 0096980 de Froehler et al., y 2002 0128218 y 2002 0123476 para Emanuele et al., y en la patente estadounidense. No. 5.721.138 de Lawn.

Otro agente capaz de regular a la baja un componente de la ruta NOTCH y/o HER2 sería cualquier molécula que se una a y/o escinda el componente de la ruta NOTCH y/o HER2. Dichas moléculas pueden ser el componente de la ruta NOTCH y/o los antagonistas de HER2, o el componente de la ruta NOTCH y/o el péptido inhibidor de HER2.

Se apreciará que un análogo no funcional de al menos una porción catalítica o de unión del componente de la ruta NOTCH y/o HER2 también puede usarse como el agente activo.

Otro agente que puede usarse junto con algunas realizaciones de la divulgación para regular a la baja el componente de la ruta NOTCH y/o HER2 es una molécula que impide su activación o unión al ADN.

Los agentes adicionales para contemplar un miembro de la ruta NOTCH incluyen un inhibidor de gamma secretasa,

un inhibidor específico de MEK o un inhibidor de PI3K-AKT.

Los ejemplos de inhibidores de gamma secretasa incluyen, pero no se limitan a, semagacestat ((2S)-2-hidroxi-3-metil-N-[(1S)-1-metil-2-oxo-2-[[[(1S))-2,3,4,5-tetrahidro-3-metil-2-oxo-1H-3-benzazepin-1-il]amino]etil]butanamida, también conocida como LY450139; Eli Lilly and Co.), el compuesto E ([[2S)-2-[[[(3,5-difluorofenil)acetil]amino]-N-[(3S)-1-metil-2-oxo-5-fenil-2,3-dihidro-1H-1,4-benzodiazepin-3-il]propanamida], disponible a través de Alexis Biochemicals), LY411575 (Eli Lilly and Co.), L-685.458 (Sigma-Aldrich), BMS-289948 clorhidrato de (4-cloro-N-(2,5-difluorofenil)-N-((1R)-{4-fluoro-2-[3-(1H-imidazol-1-il)]propil]fenil)etil]bencenosulfonamida) y BMS-299897 ácido (4-[2-((1R)-1-[[[(4-clorofenil)sulfonyl]-2,5-difluoroanilino]etil]-5-fluorofenil]butanoico (Bristol Myers Squibb), MK0752 (Merck) y MRK-003 (Merck). Estos y otros agentes se describen en Rizzo et al., *Oncogene* 27: 5124-5131 (2008); Olson y Albright, *Current Topics Medicinal Medicine* 8: 17-33 (2008); Graziani et al., *Cancer Res.* 68: 9678-9685 (2008); Rao et al., *Cancer Res.* 69: 3060-3068 (2009); Sharma et al., *Mol. Cell. Biol.* 26: 8022-8031 (2006); Cullion et al., *Blood* 113: 6172-6181 (2009); Cho et al., *J. Immunol.* 182: 3380-3389 (2009); Samon et al., *Blood* 112: 1813-1821 (2009); Joshi et al., *Blood* 113: 1689-1698 (2009); Fleisher et al., *Arch. Neurol.* 65: 1031-1038 (2009); Lanz et al., *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 319: 924-933 (2006); Spilman et al., *PNAS* 105: 10595-10600 (2008); y Namihira et al., *Dev Cell* 16: 245-255 (2009).

Un inhibidor de MEK se refiere a cualquier inhibidor de un miembro de la familia MEK de proteína quinasas, que incluye MEK1, MEK2 y MEK5. Los ejemplos de inhibidores de MEK adecuados, ya conocidos en la técnica, incluyen los inhibidores de MEK1 PD184352 y PD98059, inhibidores de MEK1 y MEK2 U0126 y SL327, y los discutidos en Davies et al., *Biochem J.*, 351: 95-105, 2000.

Se describen otros inhibidores de MEK y clases de inhibidores de MEK en Zhang et al., *Bioorganic Med. Chem. Letters*; 10: 2825-2828 (2000). Los inhibidores de MEK pueden incluir anticuerpos para, variantes negativas dominantes de, y ARNpi y ácidos nucleicos antisentido que suprimen la expresión de MEK. Los ejemplos específicos de inhibidores de MEK incluyen, pero no se limitan a, PD0325901, PD98059 (disponibles, por ejemplo, a través de Cell Signaling Technology), U0126 (disponible, por ejemplo, a través de Cell Signaling Technology), SL327 (disponible, por ejemplo, a través de Sigma-Aldrich), ARRY-162 (disponible, por ejemplo, a través Array Biopharma), PD184161, PD184352 (CI-1040), sunitinib (véase, por ejemplo, Voss, et al., US2008004287), sorafenib (véase, Voss citado más arriba), Vandetanib (véase, Voss citado más arriba), pazopanib (véase, por ejemplo, Voss citado más arriba), Axitinib (véase, Voss citado más arriba) y PTK787 (véase, Voss citado más arriba).

Actualmente, varios inhibidores de MEK están siendo sometidos a evaluaciones de ensayos clínicos. CI-1040 ha sido evaluado en ensayos clínicos de Fase I y II para el cáncer. Otros inhibidores de MEK evaluados en ensayos clínicos incluyen PD 184352 (véase, por ejemplo, English et al., 2002), BAY 43-9006 (véase, por ejemplo, Chow et al., 2001), PD-325901 (también PD0325901), GSK1120212, ARRY-438162, RDEA119, AZD6244 (también ARRY-142886 o ARRY-886), R05126766, XL518 y AZD8330 (también ARRY-704).

Un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K)-proteína quinasa B (AKT) se refiere a un agente que regula a la baja un componente de una ruta de señalización que incluye la fosforilación de una proteína Akt por una proteína PI3K.

Los ejemplos de tales inhibidores incluyen, pero no se limitan a wortmanina y LY294002.

Un ejemplo de un inhibidor de HER2 contemplado por la presente divulgación incluye Lapatinib. Se une al dominio de fosforilación intracelular de HER2 para evitar la autofosforilación del receptor tras la unión al ligando. Otros inhibidores de HER2 incluyen, pero no se limitan a, gefitinib, erlotinib, cetuximab, ABX-EGF, HKI272, AEE-788, BIBW-2992, TAK165, BMS-599626, canertinib, EKB-569 o PKI-166.

Los agentes descritos en la presente memoria se pueden proporcionar por sí mismos o como parte de una composición farmacéutica donde se mezclan con vehículos o excipientes adecuados (ya sea individualmente o en una formulación conjunta).

Tal como se usa en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

Como se usa en el presente documento, el término "ingrediente activo" se refiere a los agentes activos descritos en este documento responsables del efecto biológico pretendido.

En lo sucesivo, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa en un organismo y no anula la actividad y propiedades biológicas del compuesto administrado. Un adyuvante está incluido en estas frases.

En este documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de

celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA.

5 Las rutas de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, que incluye inyecciones intramuscular, subcutánea e intramedular, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

15 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden por lo tanto formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en reguladores fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o regulador salino fisiológico. Para la administración transmucosal, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales agentes penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

20 Para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden prepararse usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los auxiliares adecuados según se desee, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

25

30

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

35

Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, agentes estabilizantes. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la ruta de administración elegida.

40

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

45

Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de aspersión en aerosol a partir de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para usar en un dispensador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

50

La composición farmacéutica descrita en este documento puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos

55

o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

5 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones de inyección apropiadas a base de agua o aceite. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

10 Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución estéril, libre de pirógenos, a base de agua, antes de su uso.

15 La composición farmacéutica de la presente invención también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el propósito pretendido.

20 Por "cantidad o dosis terapéuticamente efectiva" o "cantidad o dosis terapéuticamente suficiente" o "cantidad o dosis efectiva o suficiente" en el presente documento se entiende una dosis que produce efectos terapéuticos para los que se administra, en el contexto de la terapia de combinación en la que se administra. Con frecuencia, la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva o suficiente de los compuestos que comprenden las composiciones farmacéuticas de la invención será menor cuando se administren en las combinaciones específicas, que las dosis que serían terapéuticamente eficaces o suficientes cuando los compuestos se administran por separado. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será comprobada por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (volúmenes 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999), Pickar, Dosage Calculations (1999) y Remington, The Science and Practice of Pharmacy, vigésima edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins). En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de agente terapéutico suficiente para reducir la cantidad de DCIS. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar la propagación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo del cáncer. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo del cáncer. En células sensibilizadas, la dosis terapéuticamente efectiva a menudo puede ser inferior a la dosis terapéuticamente efectiva convencional para células no sensibilizadas. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de un agente terapéutico que, por ejemplo, reduce la proliferación de células cancerosas, aumenta la muerte de células cancerosas o reduce el tamaño de un tumor o la diseminación de un tumor en un sujeto. Preferiblemente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico reduce la cantidad de un DCIS o la diseminación de un tumor en un sujeto en al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75 %, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% en relación con un control tal como PBS. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de un agente terapéutico que aumenta la supervivencia en 1 mes, 2 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años o más. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de un agente terapéutico que impide la progresión desde DCIS o hiperplasia atípica a cáncer de mama.

50 En ciertas realizaciones, el anticuerpo HER2 (por ejemplo, trastuzumab-MCC-DM1) se combina en una formulación de combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia de combinación, con un segundo compuesto que es capaz de regular a la baja un componente de la ruta NOTCH. El inhibidor de la ruta NOTCH de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación preferiblemente tiene actividades complementarias a las del anticuerpo HER2, y de tal manera que no se afectan adversamente entre sí.

55 La terapia de combinación se puede administrar como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente hay un período de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las que se usan actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del inhibidor de HER2 y el inhibidor de la ruta NOTCH.

60

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en este documento.

5 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la dosificación o la cantidad terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr una concentración o título deseados. Tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

10 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en este documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la ruta de administración utilizada. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista de la condición del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, E. et al. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1, página 1).

15 La cantidad de dosificación y los intervalos de administración pueden ajustarse individualmente para proporcionar suficientes niveles en plasma o cerebro del ingrediente activo para inducir o suprimir el efecto biológico (es decir, concentración mínimamente efectiva, MEC). La MEC variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y la ruta de administración. Los ensayos de detección se pueden usar para determinar las concentraciones en plasma.

20 Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una o varias administraciones, con un tratamiento de varios días a varias semanas, o hasta que se logre la cura o disminuya el estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, la forma de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

25 Es de esperar que durante la vida de esta patente, se desarrollarán muchas rutas relevantes de NOTCH e inhibidores de HER2 y el alcance de las expresiones ruta NOTCH e inhibidor de HER2 pretende incluir todas esas nuevas tecnologías *a priori*.

Otra implicación clínica del hallazgo descrito aquí es para clasificar pacientes con DCIS.

30 La determinación del fenotipo de agresividad de la lesión por DCIS puede usarse para desarrollar un plan de tratamiento para el sujeto con la lesión por DCIS. Como se señaló anteriormente, la mayoría de los DCIS son indoloros, pero debido a la propensión de algunos DCIS a volverse invasivos, muchos sujetos con DCIS reciben un tratamiento agresivo. Una prueba confiable para determinar la propensión de una lesión por DCIS a progresar a cáncer invasivo evitaría que muchos pacientes se sometieran a procedimientos innecesarios y reduciría los costos de atención médica. Aquellos sujetos cuyas lesiones son probablemente indoloras pueden tratarse controlando la lesión a lo largo del tiempo. Aquellos sujetos cuyas lesiones son probablemente agresivas pueden recibir terapia agresiva, como cirugía, radiación, quimioterapia o una combinación de los mismos. Además, la incidencia conjunta de HER2 y Notch activo puede identificar a un grupo de pacientes con DCIS que tienen un mayor riesgo de recaída después de la cirugía. Por lo tanto, los resultados de los métodos proporcionados en este documento pueden usarse para desarrollar planes de tratamiento para el sujeto o pueden usarse como un ensayo de pronóstico para proporcionar a los médicos información adicional.

40 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para clasificar DCIS en un sujeto que comprende analizar la expresión de HER2 y al menos un componente que participa en una ruta NOTCH, seleccionada del grupo que consiste en NOTCH3, HES1 y presenilina, en una muestra de mama del sujeto, en donde la expresión de cada uno de dicho HER2 y dicho al menos un componente que participa en una ruta NOTCH por encima de un nivel predeterminado es indicativo de una lesión DCIS agresiva. Típicamente, cuando la expresión de al menos un componente de la vía NOTCH se regula por incremento en más de 2 veces, más de 3 veces, más de 5 veces, el DCIS se clasifica como de alto grado y se sugiere una terapia más agresiva (por ejemplo, cirugía).

Los métodos para analizar la expresión de un componente de la ruta NOTCH y HER2 se describieron anteriormente en la presente memoria.

50 Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluyen, pero no se limitan a".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir

ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicados.

La presente invención según se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

## 5 Ejemplos

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitativa.

En general, la nomenclatura usada en este documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímica, microbiológica y recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook et al., (1989); "Protocolos actuales en Biología Molecular" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al., (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las patentes estadounidenses Nos. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique" por Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al., (eds), "Basic and Clinical Immunology" (Octava Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription y Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immvolized Cell and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., ed. (1986); "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual", CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

## Materiales y métodos

*Reactivos, líneas celulares, animales y muestras de tumores de mama:* A menos que se indique otra cosa, los reactivos se adquirieron a través de Sigma (St. Louis, MO) y anticuerpos a través de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo Notch3 se adquirió a través de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Los anticuerpos conjugados con HRP eran de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine). El ARNpi de HES1 era de Dharmacon (Lafayette, CO, EE.UU.). Se usaron los siguientes reguladores: TBST: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 0,15 M y Tween20 al 0,05%. Regulador de solubilización: HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,2 mM y un cóctel inhibidor de proteasa. El crecimiento celular se ensayó usando un kit basado en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-z-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Las células BT-474 se mantuvieron en DME/F12 con 10% de suero y antibióticos, y las células MCF10A se mantuvieron como se describió previamente (Katz et al., 2007). Las almohadillas grasas mamarias de ratones FVB HER-2/neu transgénicos o de tipo silvestre (Jackson Laboratories) se procesaron tal como se describió previamente (Tekmal et al., 2007). Las muestras de tumor de mama para RPPA se obtuvieron a través de Baylor College of Medicine Breast Center Anonymized Tumor Bank (Cohorte 1; (Speers et al., 2009)) y el M.D. Anderson Cancer Center Tumor Bank (Cohorte 2).

*Infección retroviral:* Se cotransfectaron pBMN-HER2-IRES-EGFP o pBMN-IRES-EGFP (control) con un plásmido de empaquetamiento retroviral, pSV-ψ-env-MLV en células 293T usando FuGENE (Roche Applied Science, Indianápolis) El medio que contenía el virus se recogió 48-72 horas más tarde y se pasó a través de un filtro de 45 µm. Las células MCF10A se transdujeron con control o vectores retrovirales que codifican HER2 y células que expresan en forma estable GFP después de que se seleccionaron 5 pases mediante citometría de flujo.

*Ensayos de morfogénesis:* Las células se tripsinizaron suavemente, se lavaron y se resuspendieron en medio de ensayo (DME/F12 suplementado con 2% de suero de caballo, 10 µg/mL de insulina, 1 ng/mL de toxina de cólera, 100 µg/mL de hidrocortisona, y antibióticos) a una concentración de 10<sup>5</sup> células por 4,0 mL. Se recubrieron portaobjetos de cámara de ocho pozos (BD Biosciences) con 35 µL de Matrigel<sup>MR</sup> por pozo y se dejaron solidificar durante 15 minutos. Las células se mezclaron 1:1 con medio de ensayo que contenía 5% de Matrigel<sup>MR</sup>, 20 ng/mL de EGF y 0,4 mL agregados a cada cámara. Cada cuantificación morfométrica se realizó por triplicado y se repitió tres veces.

*Inmunofluorescencia y microscopía confocal:* Las estructuras acinares se fijaron en portaobjetos de vidrio durante 10

minutos en metanol-acetona (1:1; -20°C), y se secaron al aire antes de bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente en regulador de inmunofluorescencia (NaCl 130 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,5 mM, NaN<sub>3</sub> 7,7 mM, albúmina de suero bovino al 0,1%, Triton X-100 al 0,2% y Tween-20 al 0,05% y suero de cabra al 10%). El bloqueo secundario se realizó durante 30 minutos en un regulador de inmunofluorescencia que contenía un fragmento F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-ratón (20 µg/mL). El anticuerpo primario se incubó a 4°C durante 15-18 horas. Los anticuerpos secundarios conjugados con colorantes fluorescentes y diluidos en regulador de bloqueo se incubaron posteriormente durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes inmunofluorescentes se adquirieron utilizando un microscopio invertido equipado con una cámara digital y software SPOT. La microscopía confocal se realizó utilizando la plataforma Bio-Rad Radiance 2000 equipada con un microscopio Nikon Eclipse TE300 (Oberkochen, Alemania). Las imágenes presentadas son representativas de tres o más experimentos independientes.

*PCR cuantitativa en tiempo real e hibridación de chips de oligonucleótidos:* Se aisló el ARN total usando un kit Versagene (Gentra Systems, Minneapolis) y se transcribió de forma inversa con hexámeros aleatorios (kit de síntesis de primera cadena SuperScript II, Invitrogen, California). El análisis de PCR en tiempo real se realizó utilizando SYBR Green I (Applied Biosystems) por triplicado, y los resultados se normalizaron a beta-2 microglobulina. Para la hibridación del chip de oligonucleótidos, se marcó ARN (10 µg), se fragmentó y se hibridó con matrices de Affymetrix HuGENE 1.0 ST. Después del escaneo de las matrices, se calcularon los valores de expresión génica y los resultados se normalizaron utilizando la consola de expresión de Affymetrix (normalización de RMA).

*Cultivos de mamófera en poliHEMA:* Las mamóferas se cultivaron en poliHEMA como se describió previamente (Dontu et al., 2003). Brevemente, se sembraron en placa 2.000 células en cada pozo de placas de 24 pozos revestidas con poliHEMA (Corning, Massachusetts) y se cultivaron en medio de crecimiento epitelial mamario sin suero (Biowhittaker, Rockland, Maine) complementado con B27 (Invitrogen, Carlsbad, California).

*Matrices de proteínas de fase inversa (RPPA):* La preparación de lisados celulares, el sondeo de muestras con anticuerpos y el análisis de RPPA se realizaron como se describió previamente (Hennessy et al., 2010).

#### Ejemplo 1

La sobreexpresión ectópica de HER2 confiere crecimiento autónomo a células epiteliales mamarias humanas

Los estudios previos modelaron DCIS al sobreexpresar proteínas de fusión, que comprenden HER2 (dominio intracelular) y el ectodominio del receptor para el factor de crecimiento nervioso, en células mamarias humanas inmortalizadas MCF10A (Debnath et al., 2002, Muthuswamy et al., 2001). Para modelar los efectos de HER2 de longitud completa y de tipo silvestre en DCIS, los presentes inventores construyeron células MCF10A que sobreexpresan ectópicamente la oncoproteína (C-R, Pradeep et al., Manuscrito enviado). Brevemente, las células se infectaron establemente con partículas retrovirales que codifican HER2 e IRES-GFP (en lo sucesivo denominadas células MCF10A-HER2) o IRES-GFP solo (en lo sucesivo MCF10A; (Ueda et al., 2004)). La inmunotransferencia de los lisados celulares obtenidos después de la estimulación con EGF o con neuregulina (NRG1-beta), respectivamente, confirmó que HER2 potenciaba y prolongaba la activación de la ruta ERK, así como la degradación retardada de EGFR (Figura 1A) (Pinkas-Kramarski et al., 1996; Worthylake et al., 1999). Estos efectos sobre la cinética de señalización se tradujeron en una mayor proliferación celular. A diferencia de las células MCF10A, cuyas tasas de proliferación dependían de factores de crecimiento y alcanzaron la saturación, las tasas de proliferación mejoradas de las células MCF10A-HER2 no se vieron afectadas por los factores de crecimiento y no mostraron saturación inducida por la densidad (Figura 1B). Por lo tanto, cuando se sobreexpresa en las células mamarias normales, HER2 confiere un crecimiento celular autónomo, independiente de los factores de crecimiento.

#### Ejemplo 2

HER2 induce transcripcionalmente múltiples componentes de la ruta Notch

Para resolver las bases moleculares subyacentes a la autonomía de crecimiento conferida por HER2, los presentes inventores emplearon un sistema de cultivo tridimensional (3D) de células MCF10A (revisado en (Debnath y Brugge 2005)). Cuando se cultivan en una preparación de matriz extracelular (Matrigel<sup>MR</sup>), estas células muestran la formación clonal de esferoides huecos, que se informó que experimentan relleno luminal cuando se forzó a HER2 quimérico expresado ectópicamente a formar homodímeros (Muthuswamy et al., 2001). Las presentes células MCF10A-HER2 que sobreexpresan HER2 de tipo silvestre exhibieron de forma similar el llenado luminal, incluso en ausencia de tratamientos adicionales. En particular, los esferoides MCF10A-HER2 retuvieron una estructura externa intacta sin evidencia de invasión (datos no mostrados y Figura 2D, paneles izquierdos). Para identificar los programas de expresión génica que promueven el llenado luminal, el ARN se extrajo de las estructuras tridimensionales y se hibridó a chips de oligonucleótidos. Como era de esperar, los análisis de ARNm significativamente alterados en células MCF10A-HER2 revelaron una regulación al alza de los módulos de proliferación celular y una regulación a la baja de transcritos que pertenecen a las rutas de proapoptosis. Además, se observó una regulación al alza persistente de varios componentes de la ruta Notch, incluidos dos receptores y tres ligandos JAG/DLL, así como ADAM17 y Presenilina1, proteasas que escinden y activan Notch (Figura 2A).

Congruente con la inducción simultánea en múltiples sitios de la ruta Notch, dos genes diana prototípicos de la ruta, HES1 y HES2, también mostraron expresión elevada. La inducción transcripcional de varios de estos componentes se confirmó mediante el uso de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, Figura 2B). A continuación, aplicando un inhibidor específico de MEK (U0126) se encontró que la ruta MAPK-ERK, el principal efector secuencial abajo de HER2, contribuye a la inducción transcripcional de la ruta Notch en esferoides llenos de lumen (Figura 2C).

Al perder contacto con su matriz extracelular, las células mamarias luminales, así como las células MCF10A cultivadas en esferoides, sufren anoikis, dando como resultado la formación del lumen, a menos que se activen oncogenes como HER2, que potencia la proliferación e inhibe la apoptosis (Debnath et al., 2002, Simpson et al., 2008). De acuerdo con la posibilidad de que la derivación de anoikis esté mediada por la ruta Notch, se encontró que las células MCF10A-HER2 expresaban fuertemente Notch3, mientras que los esferoides huecos formados por células MCF10A exhibían expresión relativamente débil (Figura 2D, paneles derechos). Curiosamente, tanto las células luminales como periféricas de los esferoides MCF10A-HER2 se inmunotifieron positivamente para Notch3, pero la expresión de la proteína se acentuó en el núcleo, especialmente a lo largo de los contactos de célula a célula.

La transferencia Western de lisados de monocapas confirmó que Notch3 y su producto de escisión activo, NICD, se expresaron a niveles superiores en células MCF10A-HER2 en comparación con células MCF10A (Figura 2E). Curiosamente, el tratamiento con EGF provocó efectos muy pequeños, si los hubiera, sobre la expresión de Notch3 y los niveles de NICD, de acuerdo con los requisitos y la suficiencia de la sobreexpresión de HER2. La inmunotinción de monocapas confirmó la expresión mejorada de Notch3 en células MCF10A-HER2, junto con tinción punteada para Notch3 dentro de los núcleos (Figura 2F, recuadro), que sugiere la translocación nuclear de la NICD. Notablemente, a diferencia de la localización observada de Notch3 para contactos celulares de estructuras 3D, se observó tinción difusa en monocapas celulares, que pueden estar relacionadas con diferencias entre monocapas y mamíferas y el efecto perturbador de HER2 sobre la polaridad epitelial (Aranda et al., 2006). En conjunto, la sobreexpresión de HER2 conduce a la inducción transcripcional de múltiples componentes de la ruta de supervivencia Notch, lo que aumenta la posibilidad de que Notch3 medie los efectos de HER2 en el llenado luminal.

#### Ejemplo 3

Notch3 promueve la supervivencia y la proliferación de células que sobreexpresan HER2

Para probar si se requiere Notch3 para la supervivencia y la proliferación, la expresión de Notch3 se redujo de forma estable mediante la aplicación de ARNph a las células MCF10A y MCF10A-HER2 (Figura 3A). Cuando se analizaron en monocapas, la desactivación de Notch3 disminuyó significativamente la proliferación de células MCF10A-HER2, de modo que mostraron tasas de crecimiento similares a las células MCF10A que expresan ARNph de control (Figura 3B). Notablemente, la manipulación de la expresión de Notch3 en ausencia de sobreexpresión de HER2 no afectó las tasas de crecimiento, lo que implica una asociación funcional entre un HER2 sobreexpresado y Notch3. Para analizar el efecto de la desactivación de Notch3 en cultivos 3D, se aplicaron dos enfoques distintos. El primer protocolo, un cultivo en suspensión en el polímero poliHEMA (Dontu et al., 2003), reveló que ni las células MCF10A que expresan phcontrol ni phnotch3 formaron mamíferas. De acuerdo con la capacidad de HER2 para conferir un crecimiento autónomo, las células MCF10A-HER2 formaron fácilmente mamíferas multicelulares, con desactivación de Notch3 que reduce significativamente tanto el número como el tamaño de las mamíferas (Figura 3C).

El segundo protocolo, esferoides crecidos en Matrigel<sup>MR</sup>, refleja de manera similar los papeles esenciales de Notch3. A diferencia de las células MCF10A, que desarrollaron esferoides huecos el día 8, las células que sobreexpresan HER2 desarrollaron esferoides llenos de lumen. La desactivación de Notch3 revierte en gran parte el fenotipo inducido por HER2, dando como resultado la formación del lumen (Figura 3D). La tinción de esferoides en el día 6 para la forma activa y escindida de Caspasa 3 reveló actividad luminal de esta proteasa de ejecución de apoptosis en esferoides MCF10A, así como en esferoides MCF10A-HER2 con desactivación de Notch3, en línea con la noción de que la ruta Notch permite a los sobreexpresores de HER2 evadir los anoikis (Figura 3D). En conclusión, tres enfoques de cultivo diferentes indicaron que la ruta Notch subyace a los efectos de HER2 en el crecimiento y la supervivencia mejorados de las células mamarias.

#### Ejemplo 4

La actividad de c-Myc, ciclina D y AKT inducida por Notch3 es la base del efecto promotor del crecimiento de HER2

Estudios previos implicaron a c-Myc y ciclina D1 en las señales de crecimiento y supervivencia inducidas por Notch (Cohen et al., 2010, Palomero et al.2006). Asimismo, el presente análisis por qRT-PCR reveló una expresión mucho mayor de c-Myc y ciclina D1 en esferoides MCF10A-HER2, en relación con esferoides MCF10A (Figura 4A), y la inmunotransferencia confirmó estas asociaciones a nivel de proteína (Figura 4B). La inhibición de la señalización de HER2 (utilizando el anticuerpo monoclonal Trastuzumab) o la señalización de Notch (utilizando un inhibidor de  $\gamma$ -secretasa, GSI) redujo los niveles de proteína c-Myc y ciclina D1, produciéndose una reducción máxima tras el tratamiento con la combinación de fármacos (Figura 4B). En la misma vena, el análisis de inmunotransferencia confirmó que la desactivación de Notch3 en células MCF10A-HER2 usando ARNph disminuyó la expresión tanto de

ciclina D1 como de c-Myc (Figura 4C).

Para fundamentar la conclusión de que la inducción transcripcional de Notch3 y su escisión proteolítica regulada es suficiente para inducir ciclina D1 y c-Myc, los presentes inventores expresaron ectópicamente NICD en dos líneas celulares epiteliales mamarias que no sobreexpresan HER2, MDA-MB231 y MCF10A. Como se esperaba, esto dio como resultado una regulación al alza concomitante de c-Myc y ciclina D1 (Figura 4D) (Palomero et al., 2006). A continuación, usando oligonucleótidos de ARNpi, los presentes inventores silenciaron la expresión del represor transcripcional HES1, un objetivo bien establecido de NICD, en dos líneas que sobreexpresan HER2, BT474 y MCF10A-HER2. La desactivación de HES1 mejoró la expresión de la fosfatasa lipídica PTEN, en línea con informes anteriores (Palomero et al. 2007, Whelan et al., 2007), y en consecuencia disminuyó la fosforilación activadora de AKT en serina-473 (Figura 4E). Tomados en conjunto, estos resultados implican la regulación al alza de c-Myc y ciclina D1, junto con la activación mejorada de la fosforilación de AKT, en una ruta de supervivencia HER2-Notch de las células mamarias.

Para explorar las consecuencias fenotípicas de la colaboración entre HER2 y Notch3, los esferoides MCF10A-HER2 se trataron conjuntamente con Trastuzumab y GSI. Aunque cualquier fármaco por sí solo aumenta la apoptosis de células luminales en esferoides MCF10A-HER2, su combinación eliminó casi por completo la formación de luminales llenas (Figura 4F). De forma similar, cuando se aplica a los esferoides MCF10A-HER2, los inhibidores específicos de la ruta dirigidos a MEK (U0126), c-Myc (10058-F4) o PI3K-AKT (LY-294002) mejoraron notablemente la activación de caspasa-3, lo que provocó una inhibición significativa del llenado luminal (Figura 4G). En conclusión, el eje de HER2 a Notch está relacionado con un mecanismo de evasión de apoptosis que implica c-Myc y ciclina D1, junto con el acoplamiento de HER2 para la activación de AKT.

Ejemplo 5

La expresión de Notch3 se correlaciona con los niveles de HER2 en un modelo animal y en muestras de cáncer de mama humano

Los estudios que usaron ratones transgénicos demostraron que la sobreexpresión de una forma activada de Notch1 o Notch3 en la glándula mamaria da como resultado una mayor formación de tumores mamarios (Hu et al., 2006). Los presentes resultados que usan modelos 2D y 3D de DCIS que sobreexpresan HER2 proponen que la activación de HER2 aprovecha la ruta Notch para acelerar la proliferación celular y, por lo tanto, puede apoyar tumores mamarios *in vivo*. Para probar esta predicción, los presentes inventores tiñeron las glándulas mamarias con Notch3 de ratones transgénicos que portan una forma activada del oncogén HER2/neu, bajo el control de la repetición terminal larga del virus del tumor mamario del ratón (MMTV) (Bouchard et al., 1989, Tekmal et al., 2007).

De hecho, las lesiones hiperplásicas, que se desarrollan frecuentemente en las glándulas mamarias de ratones transgénicos MMTV-HER2/neu, exhibieron tinción inmunohistoquímica homogénea de débil a moderada para Notch3, que se acentuó en las células que daban frente al lumen ductal (Figura 5A). Por el contrario, las glándulas mamarias normales de ratones no transgénicos HER2 de la misma cepa mostraron un patrón de tinción heterogéneo, con la expresión de Notch3 confinada principalmente en conductos pequeños (Figura 5A), lo que probablemente refleja un papel en la transición de conductos pequeños a maduros.

Para determinar la relevancia de los presentes hallazgos para el cáncer de mama humano, se analizaron dos conjuntos de datos clínicos (Desmedt et al., 2007, Schmidt et al., 2008), cada uno derivado de análisis de chips de oligonucleótidos de aproximadamente 200 pacientes con cáncer de mama, para posibles asociaciones entre la expresión del ARNm de HER2 y la presencia de componentes de la ruta Notch. De acuerdo con los presentes datos de expresión *in vitro* (Figura 2B), Notch3 junto con presenilina y HES1 presentaron correlaciones altamente significativas con la expresión de HER2 (Tabla 1). Curiosamente, el presente análisis encontró una débil correlación negativa entre HER2 y Notch1, aunque la coexpresión de JAG-1 y Notch1 se produce en tumores de mama humanos agresivos, que no pertenecen al subtipo HER2 (Reedijk et al., 2005).

Tabla 1

	Conjunto de datos (número de pacientes)			
	Desmedt et al., 2007 (n = 198)		Schmidt et al., 2008 (n = 200)	
	Coefficiente de Correlación (r)	valor p	Coefficiente de Correlación (r)	valor p
NOTCH3	0,312	7,23E-06	0,257	2,36E-04
PSEN1	0,355	2,67E-07	0,425	3,44E-10

Conjunto de datos (número de pacientes)				
	Desmedt et al., 2007 (n = 198)		Schmidt et al., 2008 (n = 200)	
	Coeficiente de Correlación (r)	valor p	Coeficiente de Correlación (r)	valor p
HES1	0,281	5,83E-05	0,309	6,30E-06
NOTCH1	-0,226	1,40E-03	-0,249	3,80E-04
NOTCH2	-0,100	1,61E-01	-0,306	1,03E-05

Con el fin de confirmar la asociación entre HER2 y Notch3 a nivel de la proteína en muestras clínicas, se usaron chips de proteínas de fase inversa (RPPA) (Hennessy et al., 2010). Los análisis de tumores mamarios de dos cohortes de pacientes independientes (aproximadamente 100 pacientes por cohorte) confirmaron una correlación significativa entre la forma fosforilada y activa de HER2 (p1248HER2) y Notch3 (cohorte 1:  $r = 0,43$ ,  $p = 1,55E-05$ ; cohorte 2:  $r = 0,23$ ,  $p = 2,58E-02$ ; Figura 5B). Además, en ambos conjuntos de datos, los niveles de proteína Notch3 también se correlacionaron significativamente con la expresión de EGFR ( $r = 0,37$  o  $0,28$ ;  $p < 1,00E-02$  para ambos). Los datos relacionados con paciente individuales estuvieron disponibles para la segunda cohorte, para los cuales los análisis de subgrupos revelaron la correlación de Notch3 con los niveles de HER2 ( $r = 0,31$ ,  $p = 3,16E-02$ ) y p1248HER2 ( $r = 0,34$ ,  $p = 1,80E-02$ ) en 48 pacientes con tumores poco diferenciados. Sin embargo, no se observó tal correlación en tumores moderados o bien diferenciados (HER2  $r = 0,03$ , p1248HER2  $r = 0,18$ ,  $p > 5,00E-02$  para ambos). Por otro lado, los subgrupos de pacientes definidos por edad, estado menopáusico o expresión del receptor de estrógeno (ER) y/o el receptor de progesterona (PR) no mostraron diferencias con respecto a la correlación entre Notch3 y HER2 o p1248HER2 (datos no mostrado).

En resumen, los presentes resultados *in vitro*, estudios en animales y datos clínicos prestan apoyo colectivo a una hipótesis que argumenta que la proliferación celular no invasiva asociada con lesiones mamarias que sobreexpresan HER2, tal como DCIS, está mediada por la ruta Notch. Aparentemente, al activar las rutas de proliferación y supervivencia que comprenden c-Myc, Ciclina D y AKT, la señalización de Notch media el llenado de los conductos mamarios con células que sobreexpresan HER2.

## 20 Discusión

La ruta de señalización Notch conservada evolutivamente se considera un regulador crítico de las decisiones del destino celular en el desarrollo embrionario, incluida la hematopoyesis, la neurogénesis y el desarrollo de varios órganos, como la glándula mamaria (Liu et al., 2010). Por ejemplo, la proliferación y la diferenciación de las células madre mamarias hacia los linajes de las células luminal y mioepitelial están controladas en gran parte por la ruta Notch (Shackleton et al., 2006, Stingl et al., 2006). Por lo tanto, la activación ectópica de la señalización de Notch compromete las células madre mamarias al linaje luminal, y también mejora la proliferación de las células luminales, lo que lleva finalmente a su transformación (Bouras et al., 2008). Por otro lado, la inhibición de la señalización de Notch mejora la autorrenovación, en lugar de la diferenciación, de las células madre mamarias. Por lo tanto, no es sorprendente que la ruta Notch esté ampliamente empleada por las células tumorales para impulsar su supervivencia y crecimiento. Mientras que en el cáncer de pulmón de células pequeñas, Notch puede actuar como ruta supresora tumoral (Sriuranpong et al., 2001), se identificaron mutaciones de ganancia de función y una translocación cromosómica que conduce a la activación constitutiva de Notch1 en leucemia linfoblástica aguda de células T humanas (Ellisen et al., 1991, Weng et al., 2004), se detectó amplificación génica de Notch3 en cáncer de ovario (Nakayama et al., 2007) y se observaron niveles relativamente bajos del antagonista de Notch Numb en tumores de mama (Pece et al., 2004). El presente estudio revela otro mecanismo que aprovecha la señalización de Notch para promover el crecimiento maligno. La inducción transcripcional coordinada de varios componentes de la ruta Notch (resumida en la Figura 5C) parece esencial para el aumento inducido por HER2 de la proliferación y la supervivencia de las células epiteliales mamarias. Es importante destacar que el modelo experimental 3D empleado en la presente memoria propone que la ruta HER2 a Notch, aunque promueve de forma robusta la proliferación celular independiente del factor de crecimiento, es incapaz de inducir la degradación de la membrana basal y el posterior crecimiento invasivo. Presumiblemente, se necesitan ataques adicionales para liberar el potencial migratorio de las células iniciadas por HER2. Curiosamente, se informó que la estimulación con EGF, que promueve la formación de heterodímeros de HER2 con el receptor de EGF, es suficiente para la aparición de un fenotipo invasivo de esferoides que sobreexpresan HER2 (Zhan et al., 2006).

Las líneas clínicas previas y otras líneas de evidencia son consistentes con la presente conclusión de que la sobreexpresión de HER2 en el epitelio mamario está funcionalmente ligada a la ruta Notch, y esta interacción

representa una etapa temprana en el desarrollo del cáncer de mama. Por ejemplo, un estudio reciente encontró que la expresión mejorada de Notch1 fue un evento temprano en un modelo murino de DCIS y en tumores de mama humanos, pero Notch3 y otros componentes no se analizaron (Zardawi et al., 2010). Además, estos autores informaron una asociación entre la abundancia de Notch1 y HER2, pero Notch1 alto no era pronóstico. Curiosamente, un ciclo de retroalimentación positiva puede aumentar la expresión de HER2 y Notch en tumores; la transcripción de HER2 se vio potenciada por Notch1 en un proceso que involucraba PEA3. De acuerdo con otro informe, la regulación al alza mediada por Notch de HER2 mejora el potencial iniciador del tumor de las células mamarias (Clemenz y Osipo, 2009). El presente estudio revela otra diafonía bidireccional que permite a HER2 y Notch conferir en forma colaborativa independencia del factor de crecimiento y poblar el lumen de los conductos mamarios. Debido a que HER2 no puede reclutar directamente PI3K, una enzima requerida para la señalización de supervivencia por la ruta AKT, debe acoplarse con un receptor sustituto, tal como ERBB-3/HER3 (Prigent y Gullick 1994, Wallasch et al., 1995). Los resultados presentados aquí delinean un mecanismo alternativo, análogo al modo identificado en la leucemia (Palomero et al., 2008): la activación de Notch reduce la expresión de PTEN, y por lo tanto eleva los niveles de fosfoinosítidos 3' necesarios para la estimulación con AKT.

Más allá del entendimiento de que dos rutas oncogénicas, HER2 y Notch, constituyen conjuntamente un nuevo módulo que probablemente subyace a las características de llenado luminal del DCIS, el presente estudio tiene posibles implicaciones clínicas. Hay dos implicaciones que vale la pena mencionar, especialmente a la luz del debate actual relacionado con los riesgos relativos y el tratamiento óptimo de esta neoplasia no invasiva. Por un lado, la incidencia conjunta de HER2 y Notch activo puede identificar a un grupo de pacientes con DCIS que tienen un mayor riesgo de recaída después de la cirugía. En segundo lugar, las interacciones continuas entre HER2 y Notch en etapas posteriores del desarrollo tumoral, como se señaló en nuestro estudio, resaltan el potencial de las estrategias de tratamiento que combinan anticuerpos anti-HER2 con antagonistas de Notch (tales como GSI) o con inhibidores de PI3K/AKT quinasa. Dichas combinaciones mostraron efectividad en el presente sistema modelo tridimensional, por lo que pueden resultar útiles en entornos clínicos.

## 25 Referencias

Aranda V, Haire T, Nolan ME, Calarco JP, Rosenberg AZ, Fawcett JP et al. (2006). Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol* 8: 1235-1245.

Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, Jolicoeur P (1989). Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* 57: 931-936.

30 Bouras T, Pal B, Vaillant F, Harburg G, Asselin-Labat ML, Oakes SR et al. (2008). Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell* 3: 429-441.

Clemenz AZ, Osipo C (2009). Notch1 activates ErbB-2 through a PEA3-dependent mechanism. *Cancer Research* 69: 362s.

35 Cohen B, Shimizu M, Izrailit J, Ng NF, Buchman Y, Pan JG et al. (2010). Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 123: 113-124.

Debnath J, Mills KR, Collins NL, Reginato MJ, Muthuswamy SK, Brugge JS (2002). The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 111: 29-40.

Debnath J, Walker SJ, Brugge JS (2003). Akt activation disrupts mammary acinar architecture and enhances proliferation in an mTOR-dependent manner. *J Cell Biol* 163: 315-326.

40 Debnath J, Brugge JS (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 5: 675-688.

Desmedt C, Piette F, Loi S, Wang Y, Lallemand F, Haibe-Kains B et al. (2007). Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res* 13: 3207-3214.

45 Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ et al. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 17: 1253-1270.

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD et al. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66: 649-661.

50 Hennessy B, Lu Y, Gonzalez-Angulo AM, Myhre S, Carey M, Ju Z et al. (2010). A technical assessment of the utility of reverse phase protein arrays for the study of the functional proteome in non-microdissected human breast cancers. *Clinical Proteomics*: in press.

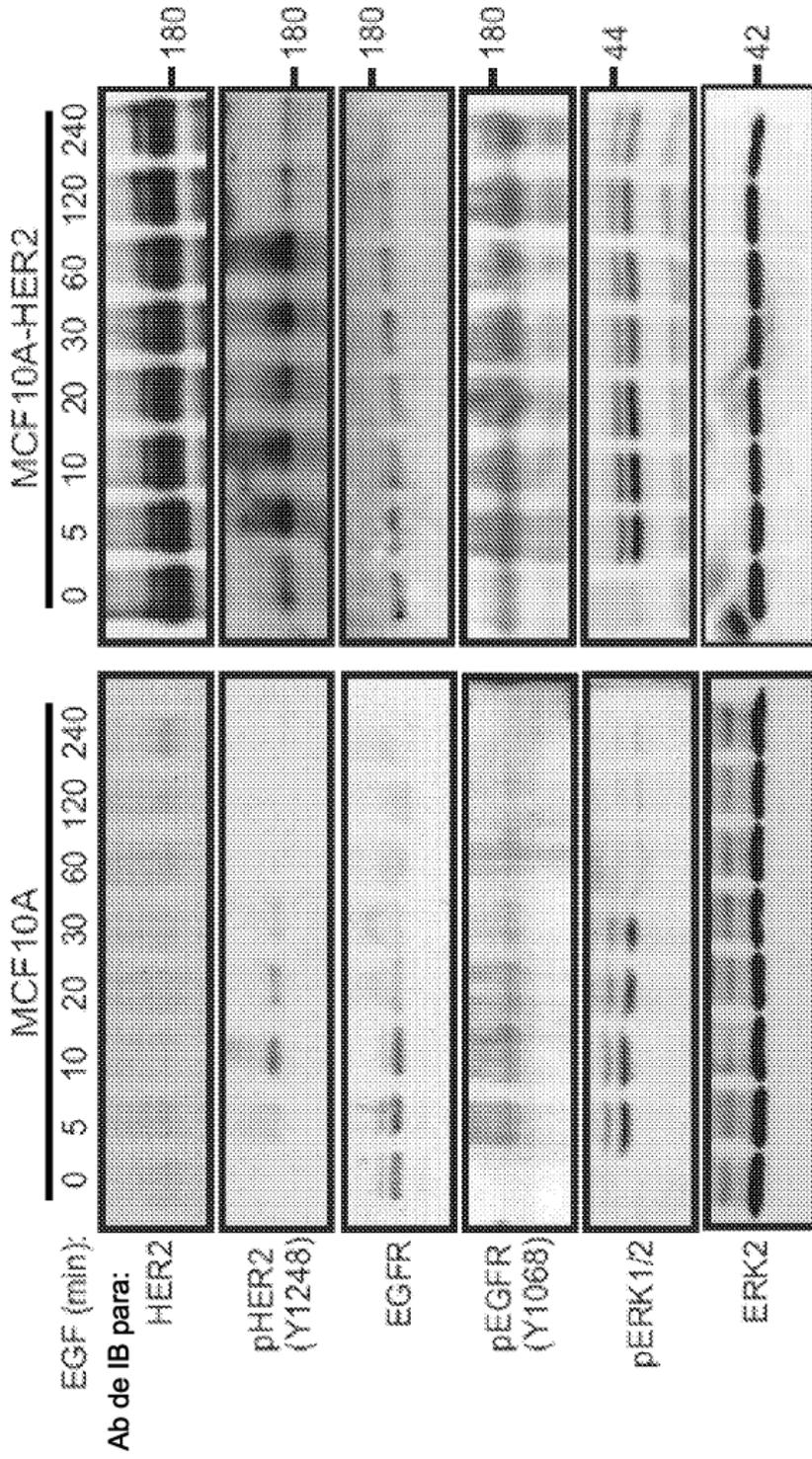
Howlin J, McBryan J, Martin F (2006). Pubertal mammary gland development: insights from mouse models. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11: 283-297.

- Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9: 1165-1172.
- 5 Ignatiadis M, Desmedt C, Sotiriou C, de Azambuja E, Piccart M (2009). HER-2 as a target for breast cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15: 1848-1852.
- Imatani A, Callahan R (2000). Identification of a novel NOTCH-4/INT-3 RNA species encoding an activated gene product in certain human tumor cell lines. *Oncogene* 19: 223-231.
- Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194: 237-255.
- 10 Jechlinger M, Podsypanina K, Varmus H (2009). Regulation of transgenes in three-dimensional cultures of primary mouse mammary cells demonstrates oncogene dependence and identifies cells that survive deinduction. *Genes Dev* 23: 1677-1688.
- Katz M, Amit I, Citri A, Shay T, Carvalho S, Lavi S et al. (2007). A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol* 9: 961-969.
- 15 Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A (2010). Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol* 92: 367-409 .
- Lonardo F, Di Marco E, King CR, Pierce JH, Segatto O, Aaronson SA et al. (1990). The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biol* 2: 992-1003.
- 20 Muthuswamy SK, Li D, Lelievre S, Bissell MJ, Brugge JS (2001). ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol* 3: 785-792.
- Nakayama K, Nakayama N, Jinawath N, Salani R, Kurman RJ, Shih le M et al. (2007). Amplicon profiles in ovarian serous carcinomas. *Int J Cancer* 120: 2613-2617.
- Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A et al. (2006). NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18261-18266.
- 25 Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M et al. (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* 13: 1203-1210.
- Palomero T, Dominguez M, Ferrando AA (2008). The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle* 7: 965-970.
- 30 Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V et al. (2004). Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 167: 215-221.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.
- 35 Prigent SA, Gullick WJ (1994). Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J* 13: 2831-2841.
- Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR et al. (2005). High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* 65: 8530-8537.
- 40 Schafer ZT, Grassian AR, Song L, Jiang Z, Gerhart-Hines Z, Irie HY et al. (2009). Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* 461: 109-113.
- Schmidt M, Bohm D, von Torne C, Steiner E, Puhl A, Pilch H et al. (2008). The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 68: 5405-5413.
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML et al. (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439: 84-88.
- 45 Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett* 272: 177-185.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-182.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A et al. (2001). Use of chemotherapy plus a

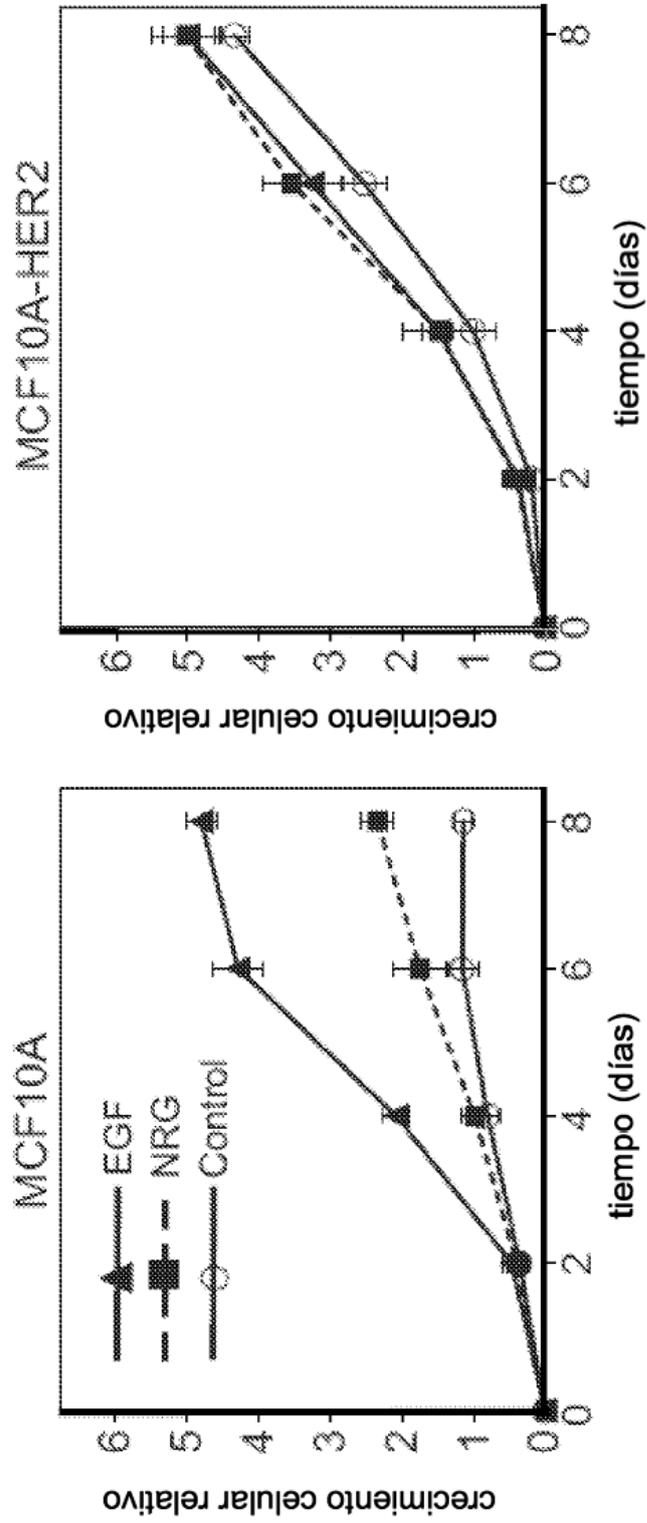
- monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783-792.
- Sriuranpong V, Borges MW, Ravi RK, Arnold DR, Nelkin BD, Baylin SB et al. (2001). Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 61: 3200-3205.
- 5 Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D et al. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 439: 993-997.
- Stylianou S, Clarke RB, Brennan K (2006). Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res* 66: 1517-1525.
- 10 Tekmal RR, Nair HB, Perla RP, Kirma N (2007). HER-2/neu x aromatase double transgenic mice model: the effects of aromatase overexpression on mammary tumorigenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 106: 111-118.
- van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O et al. (1988). Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma *in situ* and limited prognostic value in stage II breast cancer. *N Engl J Med* 319: 1239-1245.
- 15 Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 14: 4267-4275.
- Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C et al. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306: 269-271.
- Whelan JT, Forbes SL, Bertrand FE (2007). CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle* 6: 80-84.
- 20 Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137.
- Yin L, Velazquez OC, Liu ZJ (2010). Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 80: 690-701.
- Zardawi SJ, Zardawi I, McNeil CM, Millar EK, McLeod D, Morey AL et al. (2010). High Notch1 protein expression is an early event in breast cancer development and is associated with the HER-2 molecular subtype. *Histopathology* 56: 286-296.
- 25 Zhan L, Xiang B, Muthuswamy SK (2006). Controlled activation of ErbB1/ErbB2 heterodimers promote invasion of three-dimensional organized epithelia in an ErbB1-dependent manner: implications for progression of ErbB2-overexpressing tumors. *Cancer Res* 66: 5201-5208.

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación de un inhibidor de gamma secretasa y un anticuerpo capaz de unirse y regular a la baja una actividad de HER2 para su uso en el tratamiento de una lesión de carcinoma ductal *in situ* (DCIS).
- 5 2. Un método de clasificación de DCIS en un sujeto que comprende analizar la expresión de HER2 y al menos un componente que participa en una ruta NOTCH, seleccionado del grupo que consiste en NOTCH3, HES1 y presenilina, en una muestra de mama del sujeto, en el que la expresión de cada uno de dicho HER2 y dicho al menos un componente que participa en una ruta NOTCH por encima de un nivel predeterminado es indicativo de una lesión agresiva de DCIS.



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

FIG. 2B

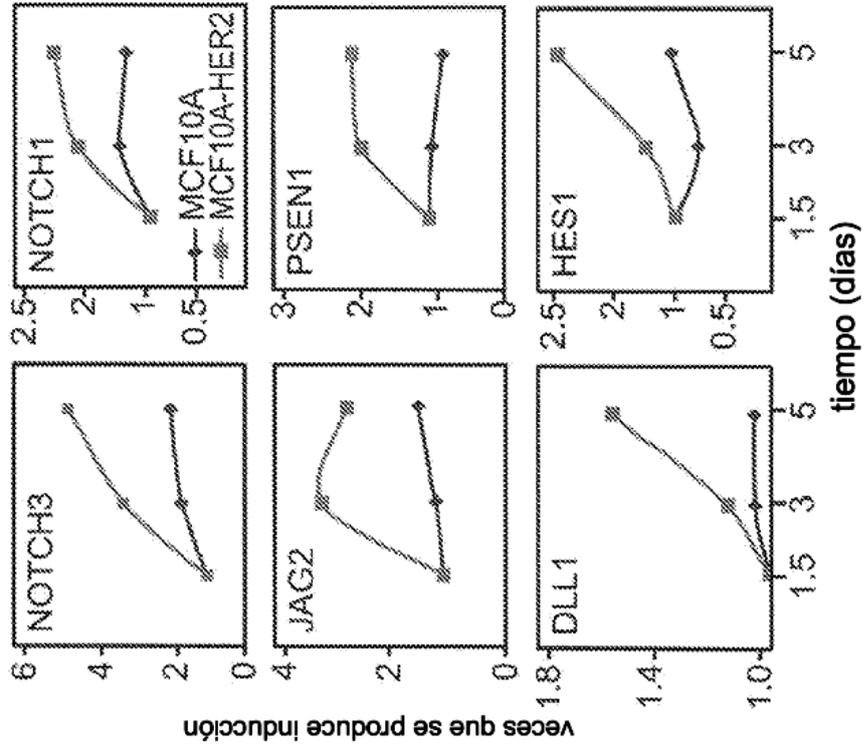


FIG. 2A

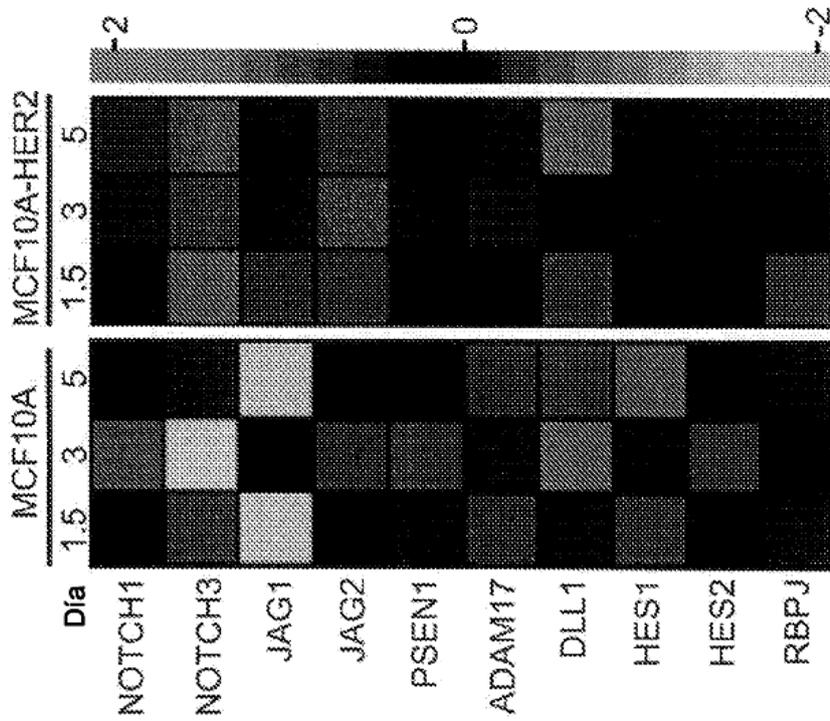


FIG. 2D

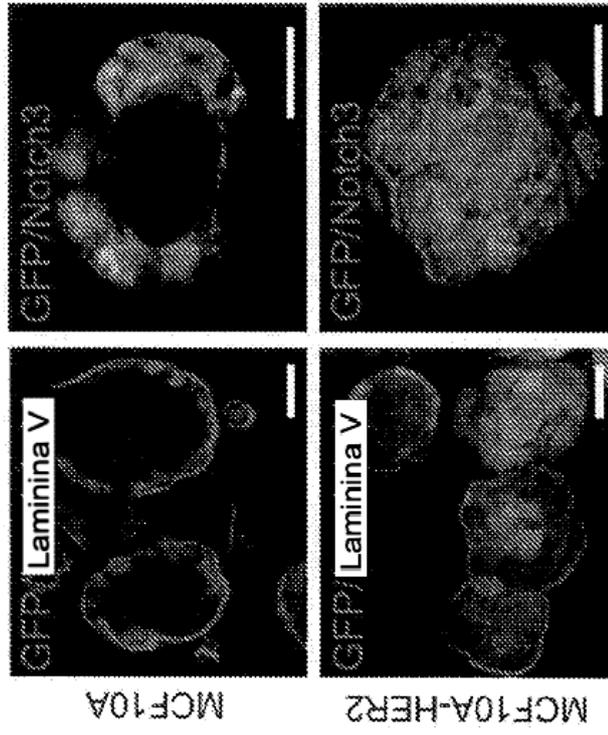


FIG. 2C

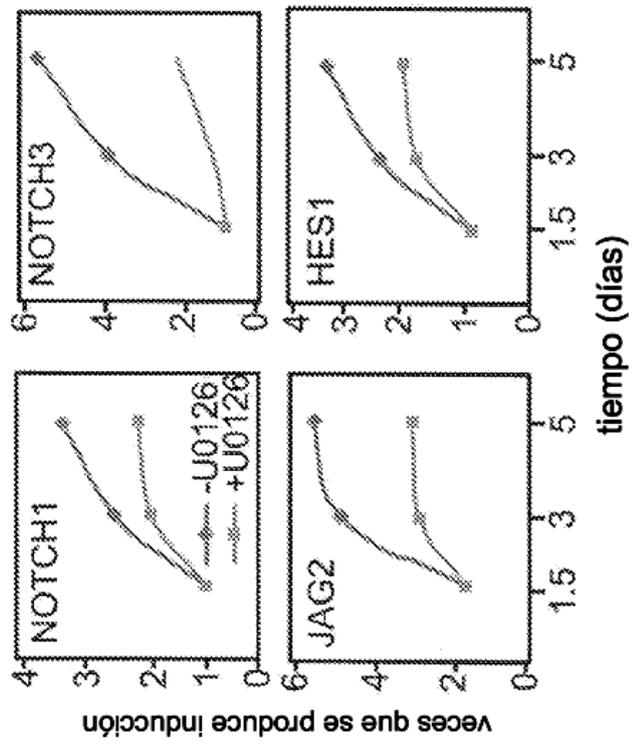


FIG. 2F

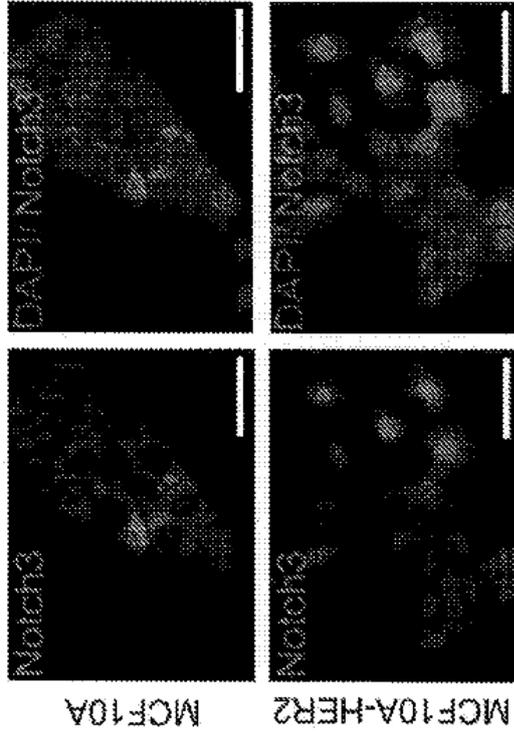


FIG. 2E

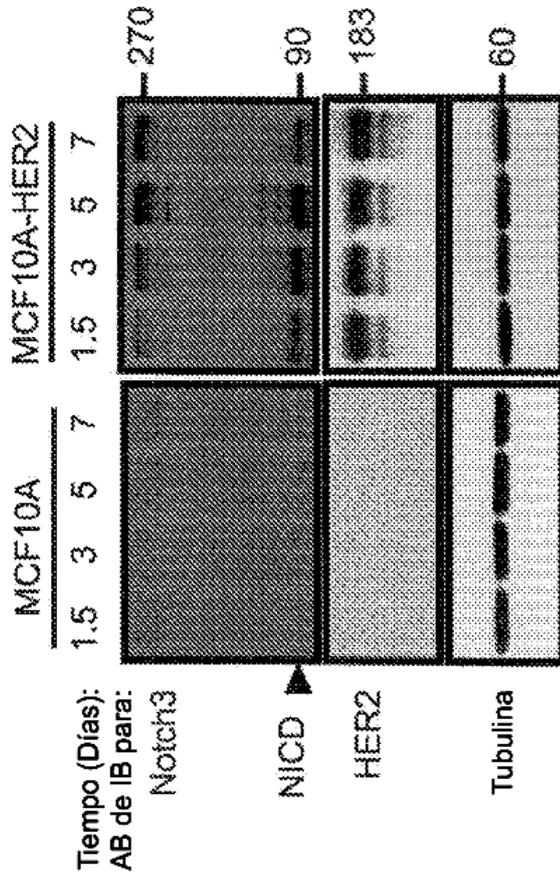


FIG. 3B

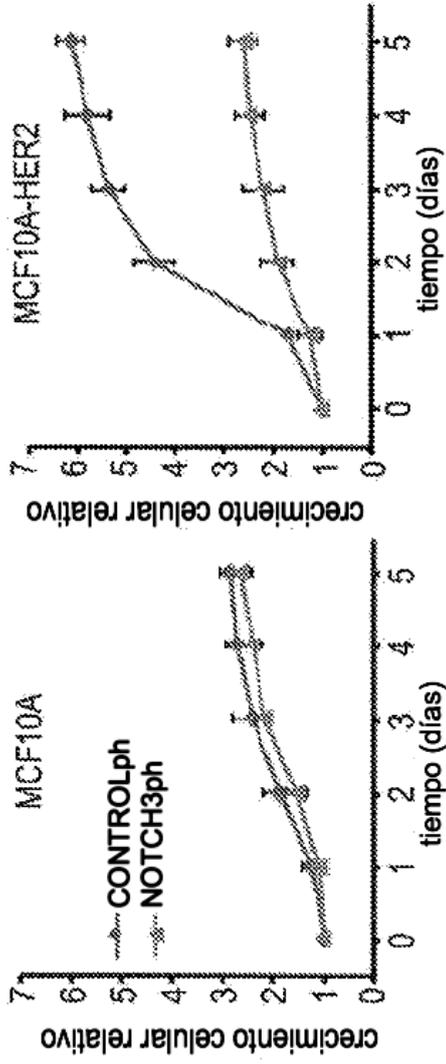
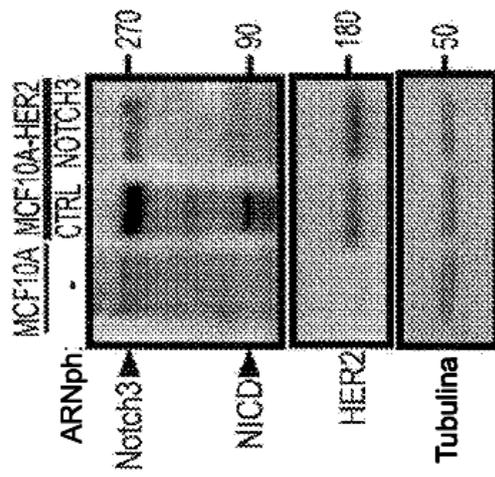


FIG. 3A



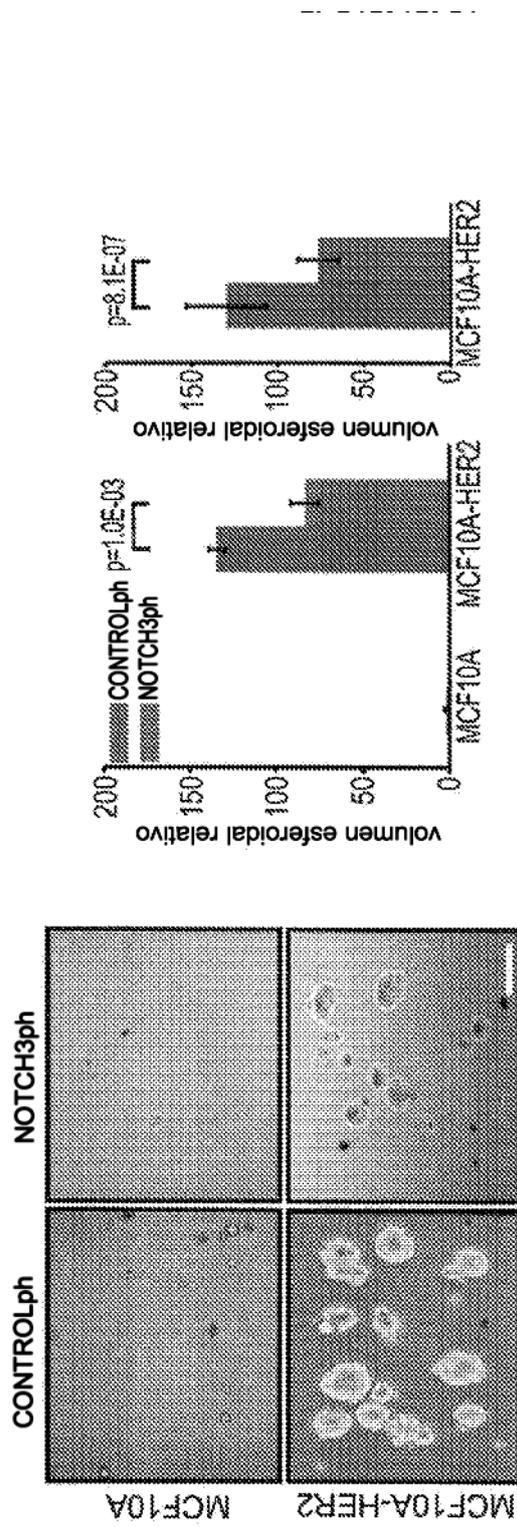


FIG. 3C

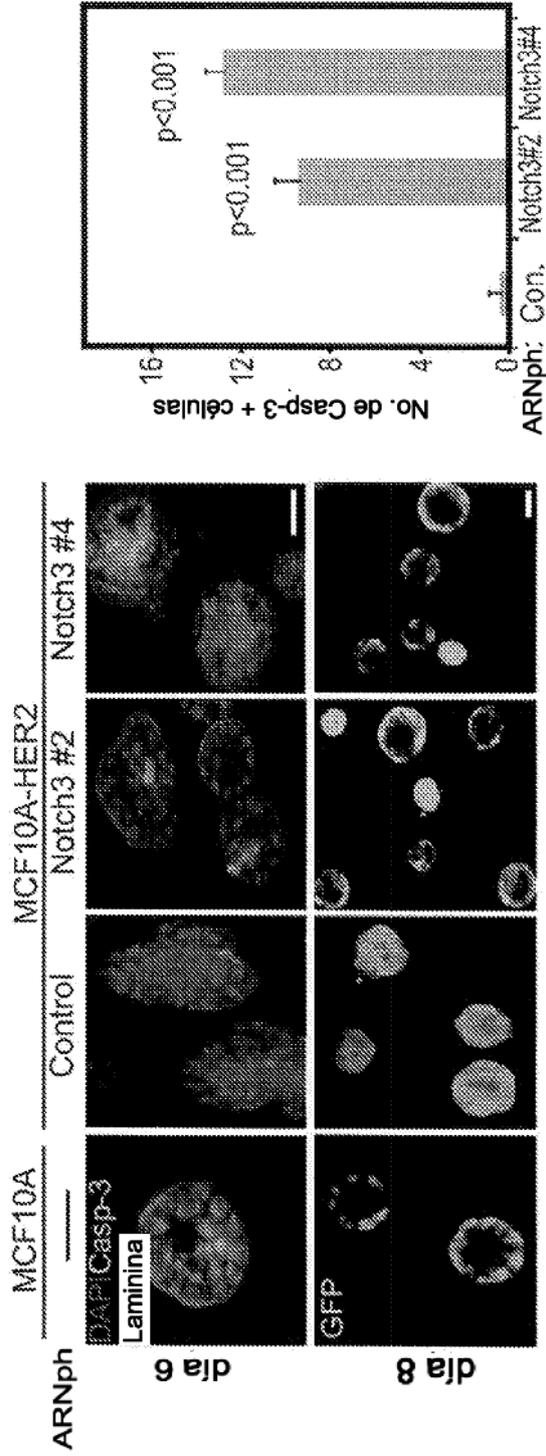


FIG. 3D

FIG. 4A

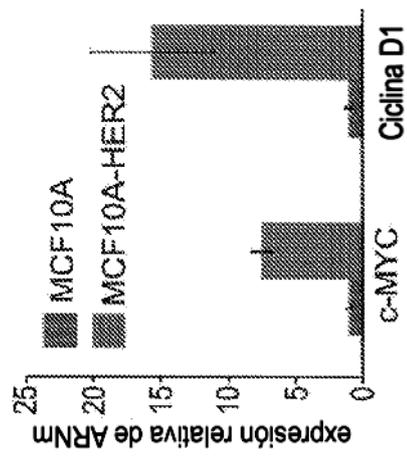
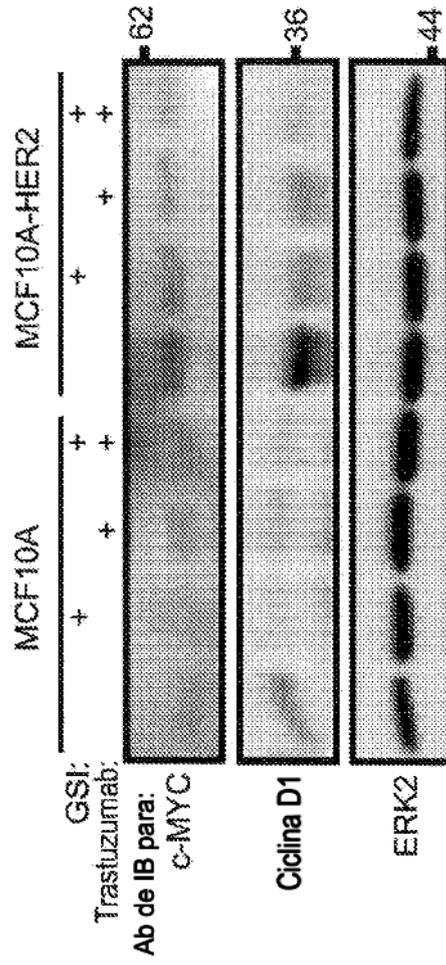
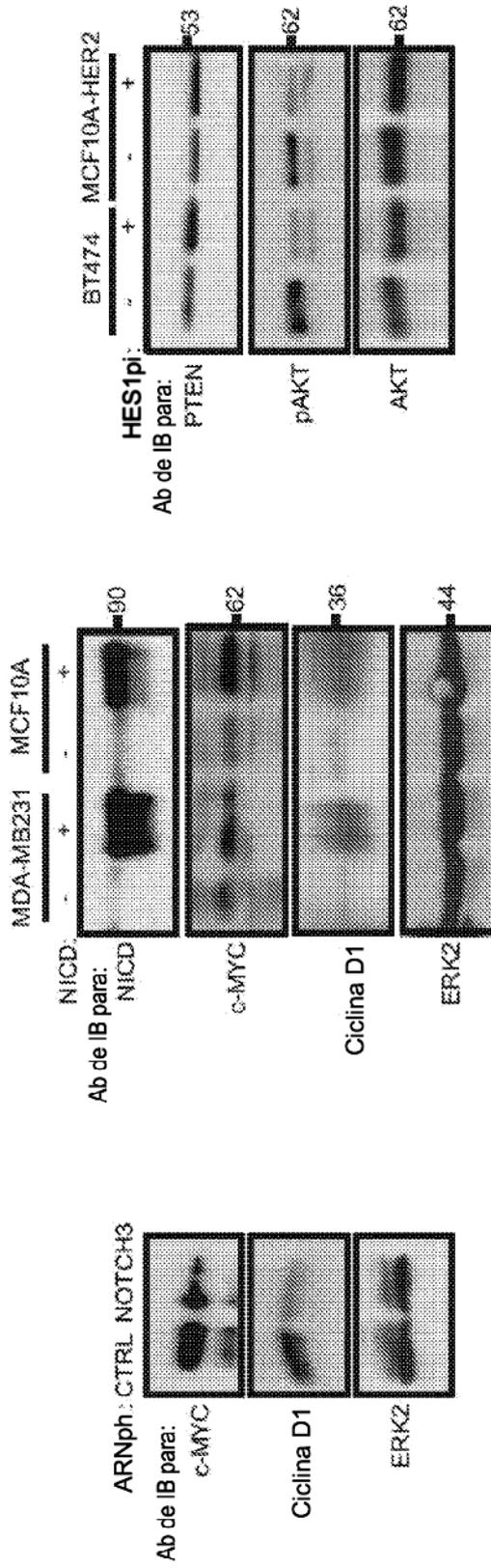


FIG. 4B





**FIG. 4E**

**FIG. 4D**

**FIG. 4C**

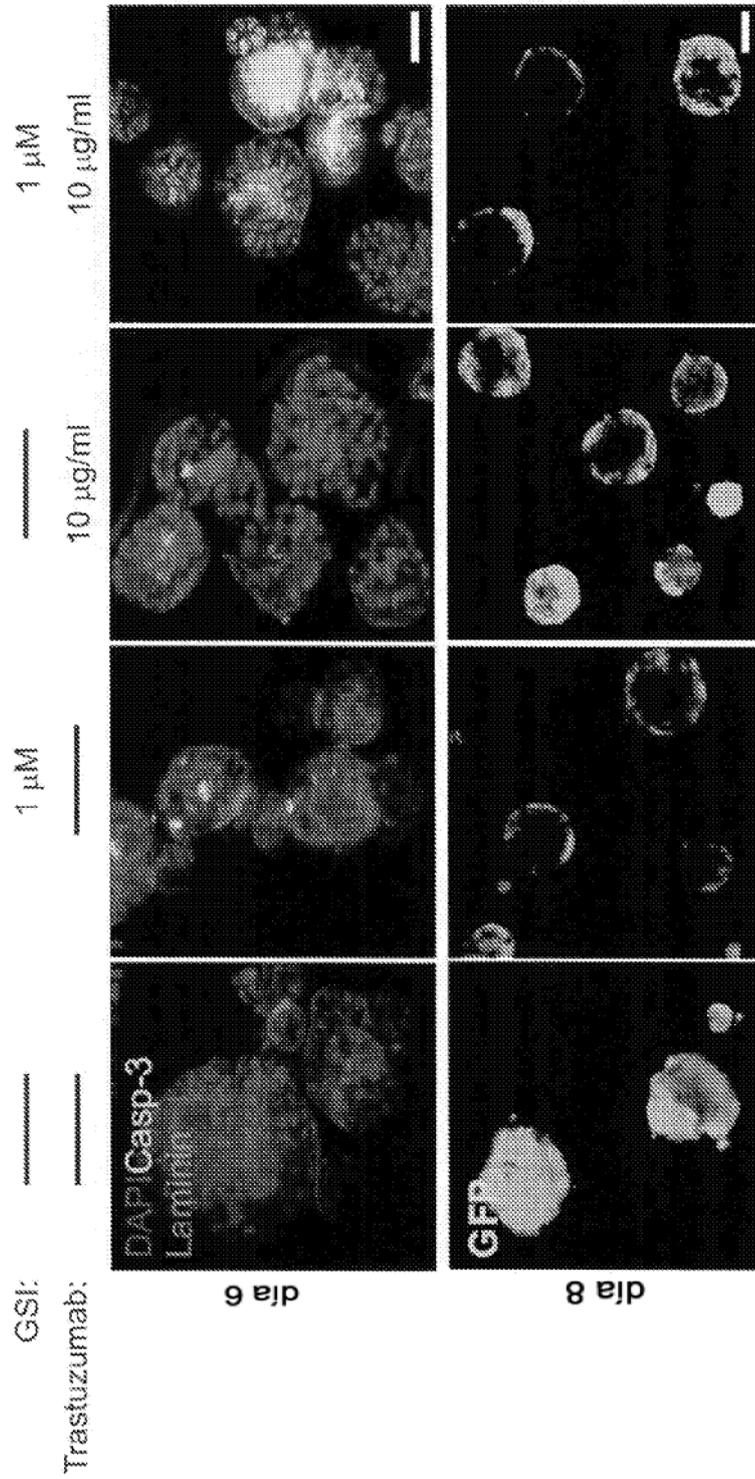
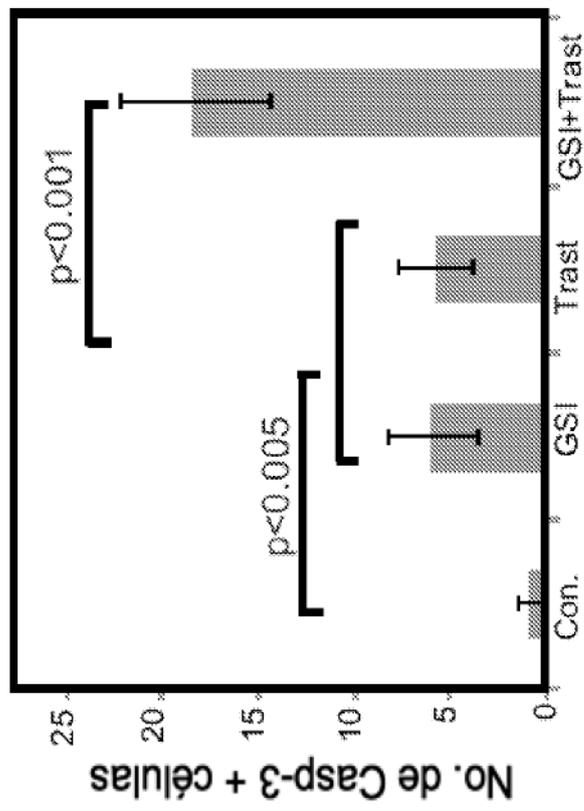


FIG. 4F



**FIG. 4G**

FIG. 5A

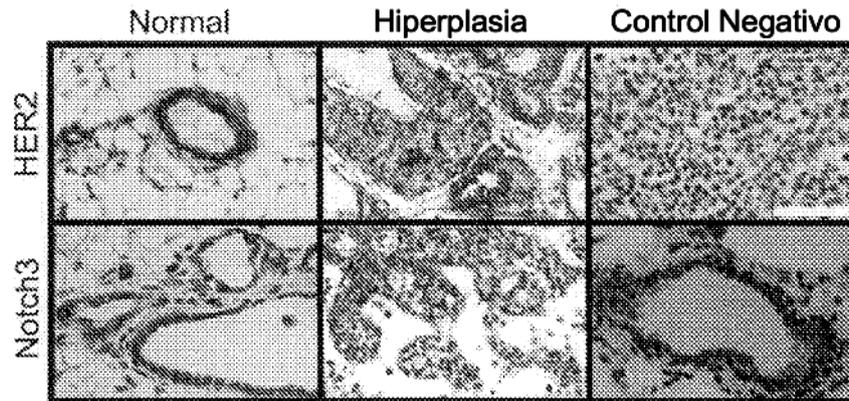
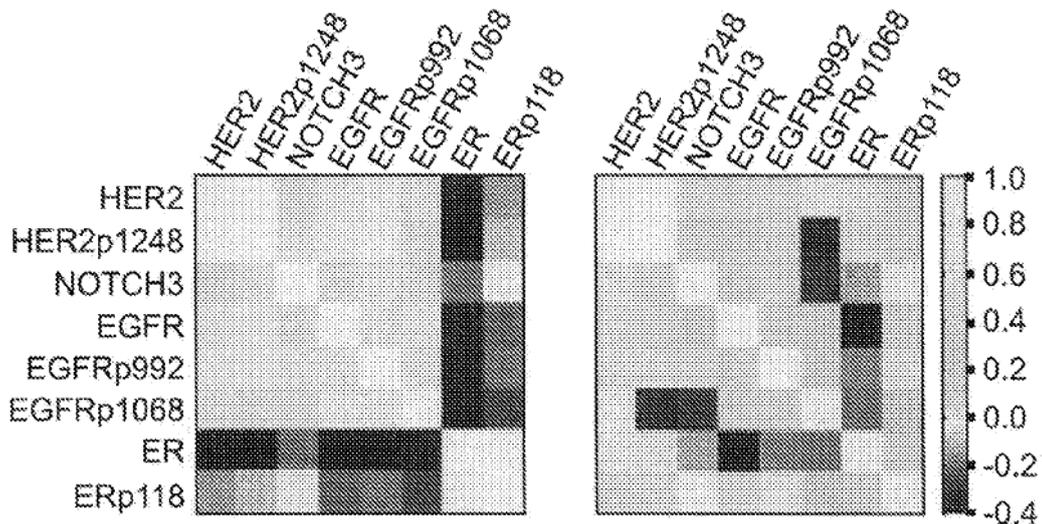


FIG. 5B



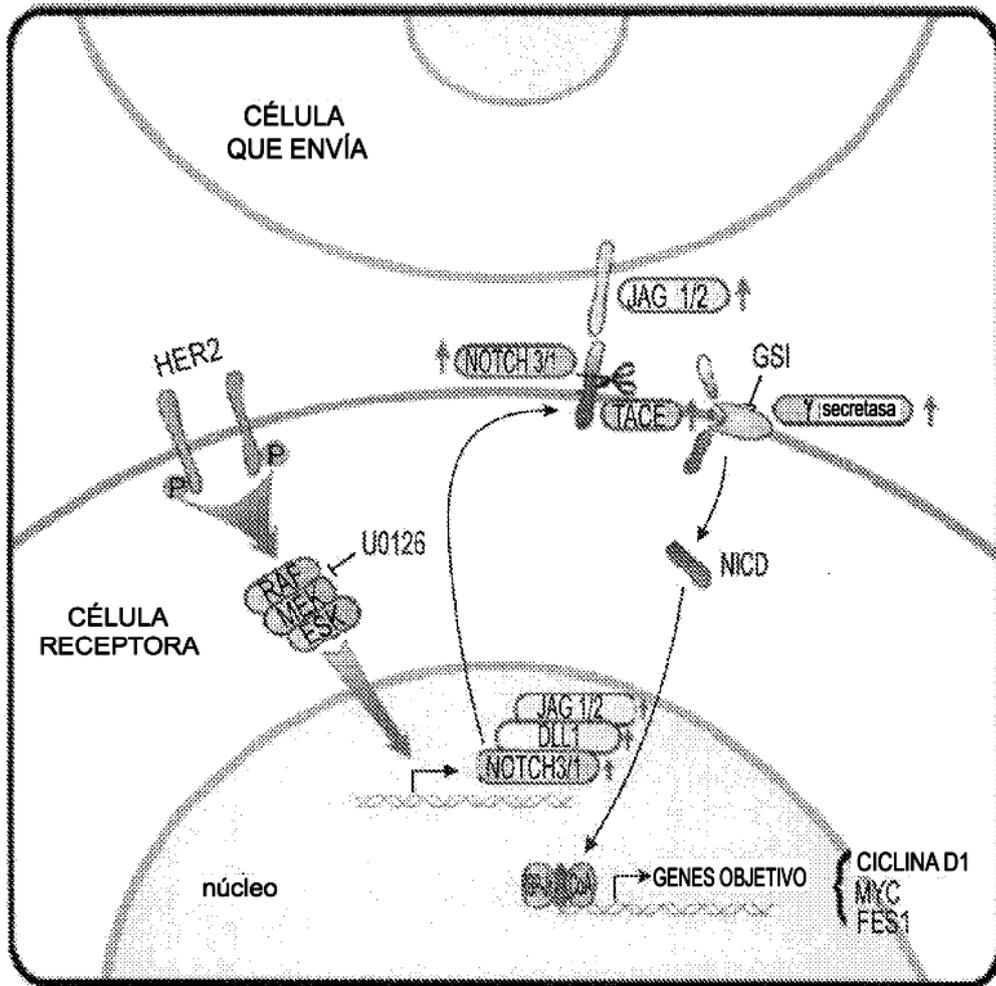


FIG. 5C