

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 723 778**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/285** (2006.01)

**A61K 33/36** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2010 PCT/US2010/048308**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11031890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2010 E 10816100 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2475362**

54 Título: **Terapia dirigida a células madre cancerosas y contra cáncer resistente a fármacos**

30 Prioridad:

**10.09.2009 US 241180 P**

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

**02.09.2019**

73 Titular/es:

**KOMINOX, INC. (100.0%)  
1 Cayman Financial Centre 36A Dr Roy's Drive  
George Town, Grand Cayman KY1-1104, KY**

72 Inventor/es:

**BURGER, ANGELIKA**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 723 778 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 dirigida a células madre cancerosas y contra cáncer resistente a fármacos

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas para tratar, reducir o eliminar células cancerosas; más particularmente, la presente invención proporciona una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio para reducir o eliminar células madre cancerosas y células cancerosas resistentes a fármacos.

10

**Antecedentes de la invención**

Los telómeros humanos son secuencias de ADN no codificantes al final de los cromosomas que están compuestas por repeticiones de hexanucleótidos (TTAGGG)<sub>n</sub>. Durante cada división celular, el ADN telomérico (30-100 pb) se pierde debido al problema de la replicación final (Blackburn D.H., Nature, 408:53-56, 2000 y Phatak, P. et al., Br. J. Pharmacol., 152: 1003-11, 2007). Los telómeros mantienen la integridad cromosómica y evitan la replicación de genes defectuosos. Dado que los cromosomas comienzan su vida con una cantidad limitada de ADN telomérico, una célula puede experimentar solo un número finito de divisiones antes de que alcance una longitud crítica de los telómeros. Cuando las células normales alcanzan la longitud crítica de los telómeros, salen del ciclo celular y experimentan senescencia replicativa (Phatak, P. et al., Br. J. Pharmacol., 152: 1003-11, 2007 y Holt, S.E. et al., Nature Biotechnol., 14: 1734-1741, 1996). Sin embargo, durante la tumorigénesis temprana de células normales a neoplásicas, los telómeros se erosionan, pero después se mantienen en una longitud corta pero estable, en la gran mayoría de los casos, a través de la reactivación de la enzima telomerasa (Blackburn D.H., Nature, 408:53-56, 2000; Phatak, P. et al., Br. J. Pharmacol., 152: 1003-11, 2007 y Holt, S.E. et al., Nature Biotechnol., 14: 1734-1741, 1996). La telomerasa es una transcriptasa inversa de la ribonucleoproteína, que actúa como plantilla para la adición de nuevas repeticiones teloméricas, y la subunidad catalítica hTERT (transcriptasa inversa de la telomerasa humana). La telomerasa permite que las células cancerosas superen las limitaciones fundamentales de la proliferación infinita y las hace inmortales. Por lo tanto, la telomerasa y los telómeros se han convertido en dianas prometedoras para las terapias contra el cáncer (Phatak, P. et al., Br. J. Pharmacol., 152: 1003-11, 2007, Chumsri, S. et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 10:323-333, 2008).

"Preclinical evaluation of sodium meta arsenite for management of chronic myeloid leukemia (CML): elimination of Leukemic stem cell by apoptosis" por I. Hariharan et al. (ISEH 38th Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2009;37 (Comp. 1): S95-S96) describe un estudio que evalúa el potencial del meta arsénico de sodio como un medicamento para la leucemia mieloide crónica.

El documento de patente WO 2011/034775 A2 describe métodos para tratar tumores cerebrales que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito sódico, en solitario o en combinación con otro medicamento antitumoral.

40

El documento de patente US 2008/0279961 A1 describe composiciones y métodos para tratar células madre cancerosas que comprenden la administración de ligandos G-quadruplex.

El documento de patente US 2002/183385 A1 describe el uso de compuestos de arsénico para tratar una diversidad de enfermedades neoplásicas.

45

El documento de patente US 2009/0011047 A1 describe composiciones farmacéuticas y métodos para el tratamiento de enfermedades urogenitales y metástasis óseas en un ser humano, en las que las composiciones contienen una cantidad eficaz de sal de metal alcalino o alcalinotérreo de ácido arsenioso y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

50

El problema principal en el desarrollo de tratamientos eficaces y finalmente curativos para el cáncer radica en el hecho de que los cánceres son heterogéneos y contienen células maduras, así como células que son responsables de la auto-renovación, denominadas células madre. Los agentes anticancerosos citotóxicos actuales están dirigidos principalmente a matar la población de células maduras, pero no pueden erradicar las células madre cancerosas. Como resultado, el cáncer a menudo regresa y los tumores comprenden entonces células cancerosas más agresivas resistentes a fármacos de tipo célula madre (Chumsri, S. et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 10: 323-333, 2008). Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos agentes terapéuticos y/o regímenes que puedan inhibir la telomerasa o el telómero objetivo para reducir o eliminar tanto las células cancerosas maduras como las de tipo célula madre,

55

incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos y las células cancerosas maduras.

### **Resumen de la invención**

- 5 En un aspecto de la invención, se proporciona un agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a paclitaxel o resistente a docetaxel que comprende (1) una composición que comprende meta arsenito de sodio y (2) una composición que comprende paclitaxel o docetaxel, respectivamente. Otros aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones expuestas a continuación.
- 10 Un método para tratar una forma refractaria de cáncer en un paciente también se describe en el presente documento. Esto se logra administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub> o KML001) en solitario o en combinación con otros agentes anticancerosos. En ciertos aspectos, el meta arsenito de sodio se administra en una dosis unitaria de 0,1 a 20 mg una o más veces al día. En ciertos aspectos, el paciente es controlado para detectar la presencia de una población de células madre después del tratamiento con meta arsenito de sodio. En ciertos aspectos diferentes, el paciente puede ser controlado durante un periodo de hasta cuatro años o más después del tratamiento con meta arsenito de sodio. En ciertos aspectos, el cáncer refractario es el cáncer de próstata, cáncer de pulmón, linfoma o leucemia.
- 15 En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona el uso de meta arsenito de sodio para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar a un paciente con cáncer que tiene un nivel en suero de IL-6 más alto de lo normal que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio y controlar el nivel de IL-6 en suero del paciente después de un tratamiento final de meta arsenito de sodio. El control del nivel de IL-6 del paciente se puede llevar a cabo periódicamente durante hasta cuatro años o más después de completar el tratamiento con meta arsenito de sodio.
- 20 En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de meta arsenito de sodio para la fabricación de una composición farmacéutica para mejorar la eficacia de un agente anticanceroso en un paciente que padece una forma de cáncer resistente a fármacos que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio y un agente anticanceroso para el cual se ha demostrado que el cáncer es farmacorresistente.
- 25 En otro aspecto más de la invención, se proporciona el uso de meta arsenito de sodio para la fabricación de una composición farmacéutica para sensibilizar células cancerosas refractarias en un paciente a un agente anticanceroso al que las células cancerosas eran resistentes previamente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de cada meta arsenito de sodio y el agente anticanceroso. El agente anticanceroso puede administrarse antes de la administración de un régimen de tratamiento con meta arsenito de sodio, después de completar un régimen de tratamiento de meta arsenito de sodio o durante la administración de un régimen de tratamiento de meta arsenito de sodio.
- 30 En aún otro aspecto de la presente descripción, se proporciona el uso de meta arsenito de sodio para la fabricación de una composición farmacéutica para inhibir o prevenir la recidiva del cáncer en un paciente. El método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio después de completar un régimen de tratamiento con uno o más agentes anticancerosos. En ciertos aspectos, el paciente es controlado para detectar la presencia de una población de células madre cancerosas después del tratamiento con meta arsenito de sodio. El control puede realizarse periódicamente durante hasta cuatro años o más.
- 35 Sin estar limitado por una teoría o mecanismo particular, la reducción o eliminación de una población de células madre cancerosas reduce o elimina la población de células cancerosas producida por la población de células madre cancerosas, y por lo tanto reduce o elimina el crecimiento de un tumor, el tamaño de un tumor, la formación de un tumor y/o la formación de metástasis. En otras palabras, la reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas impide la formación, reformación del crecimiento de un tumor y/o metástasis por parte de las células cancerosas.
- 40 De acuerdo con un aspecto, la invención se refiere al uso de meta arsenito de sodio para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio suficiente para reducir o eliminar la población de células madre cancerosas resistentes a fármacos. En otra forma de realización relacionada con este aspecto, la población de células madre cancerosas es resistente a paclitaxel. En otra forma de realización relacionada, la población de células madre cancerosas es resistente a docetaxel.
- 45
- 50
- 55

**Breve descripción de los dibujos**

5 La Figura 1A muestra la detección de la población lateral (SP) en células resistentes a DU145wt y Doc50 utilizando el colorante Hoechst 33342. La Figura 1B muestra la expresión en la superficie celular de Pgp en clones wt y resistentes de acuerdo con lo determinado por citometría de flujo. Curvas de color blanco = Células teñidas de control de isotipo de PE (ficoeritrina) y curvas de color gris = células Pgp positivas. La Figura 1C muestra los histogramas para la tinción de CD44 (curvas de color gris) en comparación con los controles de isotipo (curvas de color blanco) en células DU145 wt y resistentes a taxano. La Figura 1D muestra curvas de crecimiento que comparan paclitaxel, docetaxel y células DU145wt cuando se tratan con docetaxel en un ensayo MTT. La Figura 1E muestra curvas de crecimiento que comparan paclitaxel, docetaxel y células DU154wt cuando se tratan con KML001 en un ensayo MTT.

10 La Figura 2A muestra la población lateral de células DU145wt teñidas con tinte DCV. La Figura 2B muestra la población lateral de DU145wt tratada con el inhibidor de BCRP/ABCG2 Fumitremorgina C (FTC). La Figura 2C muestra la población lateral de DU145wt tratada con el inhibidor de Pgp/ABCB1 Verapamilo.

15 La Figura 3A muestra DU145wt tratadas con medios regulares (control). La Figura 3B muestra DU145wt con medios pretratados que contienen KML a la concentración de CI100 (13 µM) durante 72 horas. La Figura 4A muestra el ensayo de proliferación de MTT que muestra DU145/Pac200 tratadas con KML001. La Figura 4B muestra la proliferación del ensayo MTT que muestra DU145/Pac200 tratadas con GRN163L.

20 La Figura 5A muestra la población lateral de células DU145/Pac200 tratadas con solo tinte DCV. La Figura 5B muestra la población lateral de DU145/Pac200 tratadas con DCV y Fumitremorgina C (FTC). La Figura 5C muestra la población lateral de DU145/Pac200 tratadas con DCV y verapamilo. La Figura 5D muestra el ensayo de población lateral que muestra DU145/Pac200 tratadas con KML001 a la concentración de CI100. La Figura 5E muestra el ensayo de población lateral que muestra DU145/Pac200 tratadas con GRN163L a la concentración de CI100.

25 Las Figuras 6A y 6B muestran el crecimiento de células de cáncer de próstata (DU145 y DU145/pac200, respectivamente) en un ensayo clonogénico como el número promedio de colonias formadas en las líneas celulares sin tratar frente a tratadas con KML001.

30 La Figura 7 son curvas de crecimiento de un MTT estándar con cinco días de tratamiento con KML001 que compara las células no clasificadas, las fracciones SP- y SP+ de la línea celular de cáncer de próstata, DU145/Pac200.

35 La Figura 8A y 8B muestran la expresión génica de hTERT medida por RT-PCR cuantitativa. A. Nivel de transcrito de ARNm de telomerasa en las fracciones clasificadas: DU145/Pac200 SP- y SP+ tienen un nivel de expresión similar. B. Reducción del nivel de expresión de hTERT después de 72 horas de tratamiento con KML001 a CI50 y CI100 de acuerdo con lo determinado por MTT estándar.

**Descripción detallada de la invención**

40 La presente invención proporciona meta arsenito de sodio para su uso en, y el uso de meta arsenito de sodio para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer en mamíferos, particularmente en seres humanos. Esto comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio que reduzca o elimine las poblaciones de células madre cancerosas, así como células cancerosas maduras resistentes a fármacos y células madre cancerosas resistentes a fármacos.

45 Esta invención se basa, en parte, en los hallazgos de que el meta arsenito de sodio (KML001), un fármaco en ensayos clínicos de fase I/II para el tratamiento del cáncer de próstata, puede dirigirse tanto a la subunidad catalítica de la telomerasa como a los telómeros e inhibir el crecimiento de poblaciones de células maduras y células madre de líneas celulares de cáncer de próstata sin tratamiento previo de quimioterapia y resistentes a la quimioterapia.

**50 Definiciones**

Como se usa en el presente documento, el término "célula(s) madre cancerosa(s)" se refiere a una célula que puede ser un progenitor de una célula cancerosa altamente proliferativa. Una célula madre cancerosa tiene la capacidad de hacer que vuelva a crecer un tumor, como lo demuestra su capacidad para formar tumores en mamíferos inmunodeprimidos, tales como ratones, y típicamente de formar tumores tras un trasplante en serie posterior en mamíferos inmunodeprimidos, tales como ratones. Las células madre cancerosas también suelen ser de crecimiento lento en relación con la mayor parte de un tumor; es decir, las células madre cancerosas están generalmente inactivas. En ciertas formas de realización, pero no en todas, las células madre cancerosas pueden representar aproximadamente del 0,1 al 20% de un tumor.

Como se usa en el presente documento, el término "agente anticanceroso" se refiere a cualquier tratamiento para el cáncer que incluya fármacos, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, quimioterapia, incluyendo agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides de plantas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de cinasa, 5 y otros agentes antitumorales, cirugía y radioterapia.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de meta arsenito de sodio que es suficiente para prevenir el desarrollo, recidiva o aparición de células madre cancerosas o cáncer y uno o más síntomas del mismo, para potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos de 10 otra terapia, reducir la gravedad y la duración del cáncer, mejorar uno o más síntomas del cáncer, prevenir el avance del cáncer, provocar la regresión del cáncer y/o potenciar o mejorar el efecto o efectos terapéuticos de otra terapia. En ciertas formas de realización de la invención, la cantidad terapéuticamente efectiva de SMA es una cantidad que es eficaz para lograr uno, dos o tres o más de los siguientes resultados una vez que se administra: (1) una reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas; (2) una reducción o eliminación en la población de 15 células cancerosas; (3) una reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) un deterioro en la formación de un tumor; (5) erradicación, extirpación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la supervivencia, duración o tasa sin enfermedad, sin recidiva, sin progresión y/o general; (8) un aumento en la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión; (9) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o aumenta en menos del 10%, o 20 menos del 5%, o menos del 4%, o menos del 2%, (10) un aumento en el número de pacientes en remisión, (11) un aumento en la duración de la remisión, (12) una disminución en la tasa de recidiva del cáncer, (13) un aumento en el tiempo hasta la recidiva del cáncer, (14) una mejoría de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida, y (15) una reducción de la resistencia a los fármacos de las células cancerosas.

25 Como se usa en el presente documento, el término "régimen terapéuticamente eficaz" se refiere a un régimen para determinar la dosificación, temporización, frecuencia y duración de la administración de meta arsenito de sodio para el tratamiento y/o la gestión del cáncer o un síntoma del mismo. En una forma de realización específica, el régimen logra uno o más de los siguientes resultados: (1) una reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos; (2) una reducción o eliminación en la 30 población de células cancerosas; (3) una reducción en el crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) un deterioro en la formación de un tumor; (5) erradicación, extirpación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la supervivencia sin enfermedad, sin recidiva, sin progresión y/o general, (8) un aumento en la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución en la tasa de hospitalización, (10) una disminución en la 35 duración de la hospitalización, (11) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o aumenta en menos del 10%, preferiblemente menos del 5%, preferiblemente menos del 4%, preferiblemente menos del 2%, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión, (13) un aumento en la sensibilidad de las células cancerosas resistentes a fármacos de un paciente con cáncer, incluidas las células madre cancerosas, al fármaco o fármacos para los que las células cancerosas son refractarias.

40 Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero tal como uno no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono y humano), y mucho más preferiblemente un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto es un animal no 45 humano tal como un animal de granja (por ejemplo, un caballo, cerdo o vaca) y una mascota (por ejemplo, un perro o gato). En una forma de realización específica, el sujeto es un ser humano anciano. En otra realización, el sujeto es un adulto humano. En otra realización, el sujeto es un niño humano. En otra forma de realización más, el sujeto es un bebé humano.

50 Como se usa en el presente documento, el término "remisión" significa el estado de salud de un sujeto evidenciado por la ausencia de cáncer detectable, con la posibilidad de un retorno de la actividad cancerosa.

Las células madre cancerosas comprenden una subpoblación única (a menudo del 0,1-10% etc., pero hasta del 0,1 al 20% o más) de un tumor que, en relación con el 90% más o menos del tumor (es decir, la masa tumoral), son más 55 tumorigénicas, tienen un crecimiento relativamente más lento o están inactivas y, a menudo, son más resistentes a la quimioterapia que la masa tumoral. Dado que las terapias y los regímenes convencionales, en gran parte, han sido diseñados para atacar a las células de proliferación rápida (es decir, aquellas células cancerosas que comprenden la masa tumoral), las células madre cancerosas que a menudo crecen lentamente pueden ser relativamente más resistentes que la masa tumoral de crecimiento más rápido a las terapias y regímenes

convencionales. Las células madre cancerosas pueden expresar otras características que las hacen relativamente quimiorresistentes, tal como la resistencia a múltiples fármacos y las vías antiapoptóticas. Lo mencionado anteriormente constituiría una razón clave para el fracaso de los regímenes de tratamiento oncológico estándar para garantizar un beneficio a largo plazo en la mayoría de los pacientes con cánceres en estadio avanzado, es decir, el fracaso para dirigirse a y erradicar adecuadamente las células madre cancerosas. En algunos casos, una célula o células madre cancerosas es la célula fundadora de un tumor (es decir, es la progenitora de las células cancerosas que constituyen la masa tumoral).

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

Cox et al. identificaron pequeñas subfracciones de células humanas de leucemia linfoblástica aguda (ALL) que tenían los fenotipos CD34+/CD10- y CD34+/CD19-, y fueron capaces de injertar los tumores de ALL en ratones inmunodeprimidos, es decir, las células madre cancerosas. En contraste, no se observó ningún injerto de los ratones usando la masa de ALL, a pesar de que, en algunos casos, se inyectaron 10 veces más células. Véase Cox et al., "Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells", Blood 104(19): 2919-2925 (2004).

Se encontró que el mieloma múltiple contenía pequeñas subpoblaciones de células que eran CD138 y, en relación con la gran parte de la población de células de mieloma CD138+, tenía un mayor potencial clonogénico y tumorigénico. Véase Matsui et al., "Characterization of clonogenic multiple myeloma cells", Blood 103(6): 2332. Los autores concluyeron que la subpoblación de mieloma múltiple CD138 era la población de células madre cancerosas.

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

Se demostró que los cánceres de mama contenían una pequeña población de células con características de células madre (que llevan marcadores de superficie CD44+CD24bajo). Véase Al-Hajj et al., "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983-3988 (2003). Tan solo 200 de estas células, que corresponden al 1-10% de la población total de células tumorales, son capaces de formar tumores en ratones NOD/SCID. En contraste, la implantación de 20.000 células que carecían de este fenotipo (es decir, la masa tumoral) no pudo volver a hacer crecer el tumor.

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

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

Singh et al. identificaron células madre tumorales del cerebro. Cuando se aíslan y se trasplantan a ratones sin tratar, las células madre cancerosas CD133+, a diferencia de las células de la masa tumoral CD133-, forman tumores que luego pueden ser trasplantados en serie. Véanse Singh et al., "Identification of human brain tumor initiating cells", Nature 432:396-401 (2004); Singh et al., "Cancer stem cells in nervous system tumors", Oncogene 23:7267-7273

(2004); Singh et al., "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors", *Cancer Res.* 63:5821-5828 (2003).

Dado que las terapias convencionales contra el cáncer se dirigen a las células de proliferación rápida (es decir, las células que forman la masa tumoral), se cree que estos tratamientos son relativamente ineficaces para dirigirse y dañar a las células madre cancerosas. De hecho, se ha demostrado que las células madre cancerosas, incluidas las células madre de la leucemia, son relativamente resistentes a las terapias quimioterapéuticas convencionales (por ejemplo, Ara-C, daunorrubicina), así como a las terapias dirigidas más nuevas (por ejemplo, Gleevec®, Velcade®). Los ejemplos de células madre cancerosas de diversos tumores que son resistentes a la quimioterapia, y el mecanismo por el cual son resistentes, se describen en la Tabla a continuación.

10

Tipo de CSC	Resistencia	Mecanismo	Referencia
AML	Ara-C	Inactividad	Guzman. Blood '01
AML	Daunorrubicina	Eflujo de fármaco, anti-apoptosis	Costello. Cancer Res '00
AML	Daunorrubicina, mitoxantrona	Eflujo de fármaco	Wulf. Blood '01
AML		Inactividad	Guan. Blood '03
AML, MDS		Anti-apoptosis	Suarez. Clin Cancer Res '04
CML		Inactividad	Holyoake. Blood 199
CML	Gleevec ®	Inactividad	Graham. Blood '02
Mieloma	Velcade ®		Matsui. ASH 04

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

Esta invención logra ese objetivo al proporcionar un medio para administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un régimen de meta arsenito de sodio.

El cáncer o una enfermedad neoplásica, que incluye, pero sin limitación, neoplasias, tumores, metástasis, leucemias o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por el crecimiento celular descontrolado, se puede evitar, tratar y/o gestionar administrando a un sujeto que lo necesite una cantidad o régimen profiláctica o terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio. La presente invención se refiere al tratamiento del cáncer con una cantidad terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio.

La invención proporciona medios para tratar el cáncer reduciendo o eliminando las células cancerosas maduras, así como las células madre cancerosas y, en particular, células madre cancerosas resistentes a fármaco, que comprenden una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio. En ciertas formas de realización de la invención, la cantidad o régimen de meta arsenito de sodio da como resultado al menos una reducción de aproximadamente el 5% en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos. En ciertos aspectos de la presente divulgación, la reducción en la población de células madre cancerosas se monitoriza periódicamente, por ejemplo, hasta cuatro o más años después de la finalización del tratamiento con meta arsenito de sodio. Por consiguiente, en un aspecto específico, se describe en el presente documento un medio para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende: (a) una o más dosis de una cantidad eficaz de meta arsenito de sodio; (b) monitorizar la población de células madre cancerosas en el sujeto antes, durante y/o después de la administración de un cierto número de dosis y antes de la administración de una dosis posterior; y (c) detectar al menos un 5% de reducción en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos. Si, durante el transcurso de la monitorización de la población de células madre cancerosas de un paciente, se hace evidente que la población de células madre ha aumentado, el médico tratante puede administrar de nuevo meta arsenito de sodio (en solitario o junto con otro agente anticanceroso) al paciente, en la misma o diferente dosis y/o régimen de dosificación.

El meta arsenito de sodio puede administrarse al paciente en cualquier forma, incluso por vía parenteral (tal como

por vía intravenosa), intraperitoneal u oral. La dosis diaria se puede administrar en una o más dosis a lo largo del día. Un régimen de tratamiento con meta arsenito de sodio puede incluir la administración de una dosis diaria durante uno o más días, tal como de uno a diez días consecutivos o cualquier número de días entre uno y diez días, tal como de uno a cinco, cuatro, tres o dos días consecutivos. Como alternativa, el régimen de dosificación puede incluir administrar dosis de meta arsenito de sodio en el transcurso de varios días, por ejemplo, de una semana a un mes, de manera no consecutiva, por ejemplo, cada dos días o cada tres o cuatro días, por ejemplo, o días de tratamiento consecutivos, por ejemplo, tres días, seguido de días consecutivos sin tratamiento, por ejemplo, tres días y repetir el patrón o modificar el patrón según sea necesario. El profesional experto puede determinar fácilmente la manera más eficaz de administrar y la dosificación de meta arsenito de sodio necesaria para lograr el mejor resultado para el paciente en función de la salud del paciente, la edad, el tamaño, la tolerancia al fármaco y similares.

En ciertas formas de realización, la cantidad o régimen de meta arsenito de sodio da como resultado al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o un 99% de reducción en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la cantidad o régimen de meta arsenito de sodio da como resultado al menos un 5%-99%, un 5%-80%, del 5 al 40%, del 10% al 99%, del 10 al 80%, un 10-60%, un 10%-40%, del 20 al 99%, un 20%-80%, un 20%-60%, un 20%-40%, un 50%-98%, 50%-80%, o un 60%-99% de reducción en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos.

En otras formas de realización, la cantidad o régimen de meta arsenito de sodio da como resultado al menos una reducción de 1,1, 1,2-1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 o 1000 veces en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos. En algunas formas de realización, la reducción en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos, se produce después de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, o 4 años de administración del régimen. Los métodos para detectar la población de células madre cancerosas y determinar las alteraciones en la cantidad de células madre cancerosas se describen a continuación. Si se detecta un aumento en las células madre cancerosas durante el periodo de monitorización, el paciente puede ser tratado con otro régimen de meta arsenito de sodio (igual o diferente al régimen anterior) y/u otro agente o agentes contra el cáncer.

En algunas formas de realización, la cantidad o régimen de tratamiento con meta arsenito de sodio da como resultado una reducción en la población de células cancerosas, así como en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos. En ciertas formas de realización, la reducción en la población de células cancerosas, o la reducción en la población de células cancerosas y la reducción en la población de células madre cancerosas se monitorizan periódicamente. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona medios para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método: una o más dosis de una cantidad eficaz de meta arsenito de sodio; (b) monitorizar la población de células madre cancerosas y la población de células cancerosas en el sujeto antes, durante y/o después de la administración de un cierto número de dosis, y antes de la administración de una dosis posterior; y (c) detectar al menos una reducción del 5% en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos, y la población de células cancerosas en el sujeto.

En ciertas formas de realización, la cantidad o régimen de meta arsenito de sodio da como resultado al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o un 99% de reducción en la población de células cancerosas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el régimen da como resultado aproximadamente un 2%-98%, un 5%-80%, del 5 al 40%, del 10% al 99%, del 10 al 80%, un 10-60%, un 10%-40%, del 20 al 99%, un 20%-80%, un 20%-60%, un 20%-40%, un 50%-98%, 50%-80%, o un 60%-99% de reducción en la población de células cancerosas. En otras formas de realización específicas, el régimen da como resultado al menos una reducción de 1,1, 1,2-1, 5, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 o 1000 veces en la población de células madre cancerosas, incluyendo células madre cancerosas resistentes a fármacos. En algunas formas de realización, la reducción en la población de células cancerosas se produce después de dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o 10 años de administración del régimen. Los métodos para detectar la población de células cancerosas y determinar la alteración en la cantidad de células cancerosas se describen a continuación.

En algunas formas de realización, la cantidad o régimen de meta arsenito de sodio da como resultado una reducción en el tamaño de la masa tumoral, así como una reducción en la población de células madre cancerosas, incluyendo células madre cancerosas resistentes a fármacos. En ciertas formas de realización, la reducción en el tamaño de la

masa tumoral; la reducción en el tamaño de la masa tumoral y la reducción de la población de células madre cancerosas, incluyendo células madre cancerosas resistentes a fármacos; o la reducción en el tamaño de la masa tumoral, la reducción en la población de células madre cancerosas y la reducción en la población de células cancerosas se monitorizan periódicamente. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona medios para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método: (a) una o más dosis de una cantidad eficaz de meta arsenito de sodio; (b) monitorizar la población de células madre cancerosas y el tamaño de la masa tumoral en el sujeto antes, durante y/o después de la administración de un cierto número de dosis y antes de la administración de una dosis posterior; y (c) detectar una reducción de al menos un 5% en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos, y el tamaño de la masa tumoral en el sujeto).

En ciertas formas de realización, la cantidad o régimen de meta arsenito de sodio da como resultado al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 98% o un 99% de reducción en la población de células madre cancerosas, incluyendo células madre cancerosas resistentes a fármacos, y el tamaño de la masa tumoral. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el régimen da como resultado aproximadamente un 2%-98%, un 5%-80%, de un 5 a un 40%, de un 10% a un 99%, de un 10 a un 80%, un 10-60%, un 10%-40%, de un 20 a un 99%, un 20%-80%, un 20%-60%, un 20%-40%, un 50%-99%, 50%-80%, o un 60%-99% de reducción en la población de células madre cancerosas, incluyendo células madre cancerosas resistentes a fármacos, y el tamaño de la masa tumoral. En otras formas de realización específicas, el régimen da como resultado al menos una reducción de 1, 1, 1, 2-1, 5, 2, 2, 5, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 200, o 1000 veces en la población de células madre cancerosas, incluyendo células madre cancerosas resistentes a fármacos, y el tamaño de la masa tumoral. En algunas formas de realización, las reducciones en la población de células madre cancerosas, incluyendo células madre cancerosas resistentes a fármacos, y el tamaño de la masa tumoral se producen dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o 10 años de administración del régimen.

Se puede usar una serie de métodos conocidos para acceder al tamaño global del tumor. Los ejemplos no limitativos de dichos métodos incluyen métodos de imagen (por ejemplo, tomografía computarizada (TC), imágenes de resonancia magnética (MRI), ultrasonido, imágenes de rayos X, mamografía, tomografías PET, tomografías con radionúclidos, gammagrafías óseas), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen de mamas, examen de ganglios linfáticos, examen abdominal, examen rectal, palpación general), análisis de sangre (por ejemplo, prueba de antígeno prostático específico (PSA), prueba de antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba de antígeno de cáncer (CA)-125, alfa-fetoproteína (AFP), pruebas de función hepática), análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de neoplasias hematológicas), histopatología, citología y citometría de flujo.

De acuerdo con la presente descripción, el tamaño de la masa tumoral puede medirse mediante evaluaciones basadas en el tamaño de las lesiones tumorales determinadas a partir de métodos de obtención de imágenes. En aspectos específicos de la presente descripción, las evaluaciones se realizan de acuerdo con las directrices de los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST), que se exponen en Therasse, P. et al., "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors", J. del Nat. Canc. Inst. 92(3), 205-216 (2000). Por ejemplo, en aspectos específicos, las lesiones en el sujeto que son representativas del tamaño de la masa tumoral se seleccionan de manera que tengan al menos  $\geq 20$  mm en su diámetro más largo al inicio (antes del tratamiento) cuando se usan técnicas de imagen convencionales (por ejemplo, exploración TC convencional, tomografía PET, gammagrafía ósea, MRI o rayos X) y deben seleccionarse lesiones que tengan al menos  $\geq 10$  mm en su diámetro más largo al inicio cuando se usa exploración por TC en espiral.

En algunos aspectos de la presente descripción, se puede usar una combinación de técnicas de imagen y detección de marcadores séricos para evaluar la reducción en el tamaño de la masa tumoral. Los ejemplos no limitantes de dichos marcadores séricos incluyen antígeno prostático específico (PSA), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de cáncer (CA) 125 y alfa-fetoproteína (AFP).

La presente descripción describe medios para prevenir la recidiva del cáncer en un sujeto en remisión, que comprende una cantidad o régimen terapéutica o profilácticamente eficaz de meta arsenito de sodio. El método comprende administrar meta arsenito de sodio al sujeto en dosis iguales o menores que la dosis máxima tolerada (MTD) o iguales o menores que el "nivel de efecto adverso no observado" (NOAEL). Las MTD del meta arsenito de sodio se basan típicamente en los resultados de los ensayos de aumento de dosis de Fase I. En ciertos aspectos, el paciente también se trata con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente anticanceroso, tal como el agente anticanceroso utilizado en la primera línea de tratamiento del paciente en remisión. El segundo agente

anticanceroso puede administrarse simultáneamente, después o antes de la administración de meta arsenito de sodio.

El NOAEL, de acuerdo como se determina en estudios con animales, se usa a menudo para determinar la dosis inicial máxima recomendada para ensayos clínicos en seres humanos. Los NOAEL pueden extrapolarse para determinar dosis equivalentes en seres humanos (HED). Típicamente, dichas extrapolaciones entre especies se realizan basándose a las dosis que se normalizan con respecto al área de superficie corporal (es decir, mg/m<sup>2</sup>). En aspectos específicos, los NOAEL se determinan en ratones, hámsteres, ratas, hurones, cobayas, conejos, perros, primates, primates (monos, títes, monos ardilla, babuinos), microcerdos y minicerdos. Para un análisis sobre el uso de NOAEL y su extrapolación para determinar las dosis equivalentes en seres humanos, véase Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology, julio de 2005. Por consiguiente en ciertos aspectos, el régimen comprende administrar una terapia a una dosis menor que la HED. Por ejemplo, aquí se describe un medio para prevenir la recidiva del cáncer en un sujeto en remisión, que comprende una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un régimen de meta arsenito de sodio, comprendiendo el método administrar meta arsenito de sodio al sujeto en una dosis igual o menor que la HED.

De acuerdo con la invención, se administra una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio a sujetos con cáncer. En otro aspecto de la presente divulgación, se administra una cantidad profiláctica y/o terapéuticamente eficaz de régimen de meta arsenito de sodio a sujetos que se espera que desarrollen cáncer (por ejemplo, sujetos con una predisposición genética para un tipo particular de cáncer, sujetos que no han recibido tratamiento para el cáncer, sujetos que han tenido una recaída del cáncer, o sujetos que están en remisión de un cáncer en particular). En un aspecto específico, el sujeto está en remisión o está libre de cáncer de acuerdo con lo medido por las técnicas utilizadas actualmente, incluyendo, pero sin limitación, examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen de mamas, examen de ganglios linfáticos, examen abdominal, control dermatológico, palpación general), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), análisis de frotis PAP (cáncer de cuello del útero), análisis de guayacol en heces, análisis de sangre (por ejemplo, prueba de recuento sanguíneo completo, prueba de antígeno prostático específico (PSA), prueba de antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba de antígeno de cáncer (CA)-125, alfa-fetoproteína (AFP), pruebas de función hepática), análisis de cariotipo, análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de neoplasias hematológicas), histología, citología, análisis de esputo y métodos de imagen (por ejemplo, tomografía computarizada (TC), imágenes de resonancia magnética (MRI), ultrasonido, imágenes de rayos X, imágenes de mamografía, tomografías PET, tomografías con radionúclidos, gammografías óseas). Dichos sujetos pueden o no haber sido tratados previamente contra el cáncer.

En una realización, se proporciona un medio para tratar el cáncer de un sujeto que se está sometiendo o que se ha sometido a una cirugía para extirpar un tumor, células cancerosas o neoplasias, comprendiendo el medio una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio. De acuerdo con la presente descripción, se administra una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio a un sujeto simultáneamente o después de una cirugía para extirpar un tumor, células cancerosas o una neoplasia. En otro aspecto, se administra una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio a un sujeto antes de la cirugía para extirpar un tumor o neoplasia y, en algunas formas de realización, durante y/o después de la cirugía.

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se administra una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio a sujetos que se someterán, se están sometiendo o se han sometido a radioterapia. Entre estos sujetos se encuentran aquellos que han recibido quimioterapia, terapia hormonal y/o terapia biológica, incluida la inmunoterapia, así como aquellos que se han sometido a una cirugía.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se administra una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio a sujetos que recibirán, reciben o han recibido terapia hormonal y/o terapia biológica, incluida inmunoterapia y/o terapia dirigida. Entre estos sujetos se encuentran aquellos que han recibido quimioterapia y/o radioterapia, así como aquellos que se han sometido a una cirugía.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se administra una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio a un sujeto de una o más terapias fallidas o refractario a una o más terapias. Que un cáncer sea refractario a una terapia significa que al menos una porción significativa de las células cancerosas no se elimina o se detiene su división celular. La determinación de si las células cancerosas son refractarias se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar el efecto de una terapia en células cancerosas, utilizando los significados aceptados en la técnica de "refractario" en tal contexto. La

invención reivindicada se refiere a un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de cáncer resistente a paclitaxel o resistente a docetaxel.

De acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se administra una cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio a pacientes con niveles elevados de citocina IL-6, que se ha asociado con el desarrollo de resistencia a las células cancerosas a diferentes regímenes terapéuticos, tales como quimioterapia y terapia hormonal.

La invención reivindicada se refiere al tratamiento del cáncer de próstata. También se describe en el presente documento que cualquier tipo de cáncer se puede prevenir, tratar y/o gestionar de acuerdo con la presente descripción. Los ejemplos no limitativos de cánceres que se pueden prevenir, tratar y/o gestionar de acuerdo con la descripción incluyen: leucemias, tales como, pero sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como, leucemia mieloide, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, y eritoleucemia y síndrome mielodisplásico (MDS); leucemias crónicas, tales como, pero sin limitación, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, pero sin limitación, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, por ejemplo, mieloma múltiple indolente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de importancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conjuntivo tales como, por ejemplo, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama, incluyendo, pero sin limitación, carcinoma ductal, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget, y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal, tal como, pero sin limitación, feocromocitoma y carcinoma corticosuprarrenal; cáncer de tiroides tal como, por ejemplo, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer medular de tiroides y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas tal como, pero sin limitación, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres hipofisarios tales como, pero sin limitación, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia, y diabetes insípida; cánceres oculares tales como, pero sin limitación, melanoma ocular, tal como melanoma de iris, melanoma coroideo, y melanoma del cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y melanoma; cáncer de la vulva, tales como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma, y enfermedad de Paget; cánceres de cuello del útero tales como, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas, y adenocarcinoma; cánceres del útero tales como, pero sin limitación, carcinoma de endometrio y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como, pero sin limitación, carcinoma epitelial de ovario, tumor de bajo potencial, tumor de células germinales, y tumor estromal; cánceres esofágicos tales como, pero sin limitación, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso, y carcinoma de células en avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como, pero sin limitación, adenocarcinoma, fungiformes (polipoides), ulcerante, propagación superficial, propagación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma, y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado tales como, pero sin limitación, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar tal como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como, pero sin limitación, papilares, nodulares, y difusos; cánceres de pulmón, tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares tales como, pero sin limitación, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata tales como, pero sin limitación, neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomiomas, y rhabdomyosarcoma; cánceres penales; cánceres orales tales como, pero sin limitación, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales tales como, pero sin limitación, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide, y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe tales como, pero sin limitación, cáncer de células escamosas, y verrugoso; cánceres de piel tales como, pero sin limitación, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de propagación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como, pero sin limitación, carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipemefroma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/o

útero); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como, pero sin limitación, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares.

La cantidad o régimen profiláctica y/o terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio también es útil en el tratamiento, prevención y/o gestión de una diversidad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales, incluyendo (pero sin limitación) las siguientes: carcinoma, incluyendo el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides y piel; incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma, y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xenoderoma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular tiroideo y teratocarcinoma. En algunas formas de realización, los cánceres asociados con aberraciones en la apoptosis se tratan de acuerdo con los medios de la invención. La presente invención se refiere a un medio para tratar el cáncer de próstata. En el presente documento también se describen medios para tratar los cánceres que pueden incluir, pero sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores dependientes de hormonas de la mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos. En una forma de realización específica, los cambios de malignidad o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o los trastornos hiperproliferativos de la próstata pueden tratarse con los medios de la presente invención. En otros aspectos de la presente descripción, los cambios de malignidad o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos de la piel, pulmón, hígado, hueso, cerebro, colon, seno, próstata, vejiga, riñón, páncreas, ovario, y/o útero se previenen, se tratan y/o se gestionan de acuerdo con los medios descritos en el presente documento. En otros aspectos específicos, un sarcoma o melanoma se previene, se trata y/o se gestiona de acuerdo con los medios descritos en el presente documento.

En ciertos aspectos, el cáncer que se previene, se trata y/o se gestiona de acuerdo con la presente descripción es leucemia, linfoma o mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple).

Los ejemplos no limitantes de leucemias y otros cánceres transmitidos por la sangre que se pueden prevenir, tratar y/o gestionar con los métodos de la presente descripción incluyen leucemia linfoblástica aguda "ALL", leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia mieloide aguda "AML", leucemia promielocítica aguda "APL", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia no diferenciada aguda, leucemia mielocítica aguda "CML", leucemia linfocítica aguda "CLL", síndrome mielodisplásico "MDS" y leucemia de células pilosas.

Los ejemplos no limitativos de linfomas que se pueden prevenir, tratar y/o gestionar de acuerdo con los métodos de la presente descripción incluyen enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada y policitemia vera.

En otra realización, el cáncer que se está tratando, de acuerdo con la invención, es un tumor sólido que es cáncer de próstata. Otros ejemplos de tumores sólidos que pueden prevenirse, tratarse y/o gestionarse de acuerdo con los métodos de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello del útero, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma,

ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

En una forma de realización, la dosis de meta arsenito de sodio administrada a un sujeto para tratar el cáncer en un paciente es de 500 mg/kg o menos, tal como 250 mg/kg o menos, 100 mg/kg o menos, 95 mg/kg o menos, 90 mg/kg o menos, 85 mg/kg o menos, 80 mg/kg o menos, 75 mg/kg o menos, 70 mg/kg o menos, 65 mg/kg o menos, 60 mg/kg o menos, 55 mg/kg o menos, 50 mg/kg o menos, 45 mg/kg o menos, 40 mg/kg o menos, 35 mg/kg o menos, 30 mg/kg o menos, 25 mg/kg o menos, 20 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos, 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 2,5 mg/kg o menos, 2 mg/kg o menos, 1,5 mg/kg o menos, o 1 mg/kg o menos del peso corporal de un paciente. Por ejemplo, el meta arsenito de sodio se puede administrar en una cantidad en el intervalo de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg, o de 0,25 mg/kg a 5 mg/kg de una a cinco veces al día.

En otra forma de realización, la dosis de meta arsenito de sodio administrada a un sujeto para tratar el cáncer en un paciente es una dosis unitaria de 0,1 mg a 20 mg, de 0,1 mg a 15 mg, de 0,1 mg a 12 mg, de 0,1 mg a 10 mg, de 0,1 mg a 8 mg, de 0,1 mg a 7 mg, de 0,1 mg a 5 mg, de 0,1 a 2,5 mg, de 0,25 mg a 20 mg, de 0,25 a 15 mg, de 0,25 a 12 mg, de 0,25 a 10 mg, de 0,25 a 8 mg, de 0,25 mg a 7 mg, de 0,25 mg a 5 mg, de 0,5 mg a 2,5 mg, de 1 mg a 20 mg, de 1 mg a 15 mg, de 1 mg a 12 mg, de 1 mg a 10 mg, de 1 mg a 8 mg, de 1 mg a 7 mg, de 1 mg a 5 mg, o de 1 mg a 2,5 mg.

En ciertas formas de realización, la dosis de meta arsenito de sodio administrada a un sujeto para tratar el cáncer en un paciente está en el intervalo de 0,01 a 10 g/m<sup>2</sup>, y más típicamente, en el intervalo de 0,1 g/m<sup>2</sup> a 7,5 g/m<sup>2</sup>, del peso corporal del sujeto. En una realización, la dosis administrada a un sujeto está en el intervalo de 0,5 g/m<sup>2</sup> a 5 g/m<sup>2</sup>, o de 1 g/m<sup>2</sup> a 5 g/m<sup>2</sup> del área de superficie corporal del sujeto.

La cantidad o régimen terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio se administra en combinación con una o más terapias adicionales. Las dosis de una o más terapias adicionales utilizadas en la terapia de combinación pueden ser más bajas que las que se han utilizado o se están utilizando actualmente para prevenir, tratar y/o gestionar el cáncer en el paciente. Las dosis recomendadas de una o más terapias adicionales utilizadas actualmente para la prevención, tratamiento y/o gestión del cáncer pueden obtenerse a partir de cualquier referencia en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, Hardman et al., eds., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics, 10<sup>a</sup> ed, Mc-Graw-Hill, Nueva York, 2001; Physician's Desk Reference (60<sup>a</sup> ed., 2006).

La presente invención se refiere a un agente terapéutico que contiene una composición que comprende paclitaxel o docetaxel. Otros ejemplos de terapias adicionales para el cáncer incluyen, pero sin limitación: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleukina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; arnsacrina; anastrozol; antraciclina; antrarnicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina (Vidaza); azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bisfosfonatos (por ejemplo, pamidronato (Aredria), clondronato sódico (Bonefos), ácido zoledrónico (Zometa), alendronato (Fosamax), etidronato, ibandomato, cimadronato, risedromato, y tiludromato); bizelesin; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina (Ara-C); dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina (Dacogen); agentes de desmetilación; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflomitina; inhibidores de EphA2; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato de estramustina sódico; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; fluorocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; inhibidores de histone desacetilasa (HDAC-I); hidroxiaurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; mesilato de imatinib. (Gleevec, Glivec); interleucina II (incluyendo interleucina recombinante II, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreótido; lenalidomida (Revlimid); letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, sipilizumab (MedImmune Inc.; Publicación Internacional N.º WO 02/098370)); acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcin; mitocromin; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatino; oxaliplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfán;

clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfin; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporeotide; verteporfin; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorrubicina. De acuerdo con la presente descripción, se puede usar meta arsenito de sodio en combinación con cisplatino en el tratamiento del cáncer primario o secundario, tal como cáncer de pulmón.

El meta arsenito de sodio y la una o más terapias contra el cáncer adicionales pueden administrarse por separado, simultáneamente, o secuencialmente o de cualquier manera que sea mejor para la tolerancia del paciente. La combinación de agentes puede administrarse a un sujeto por la misma o diferentes vías de administración. En formas de realización alternativas, dos o más agentes profilácticos o terapéuticos se administran en una única composición.

Como parte de la cantidad o régimen profiláctica y/o terapéuticamente eficaz de meta arsenito de sodio, la población de células madre cancerosas puede controlarse para evaluar la eficacia de la terapia o régimen, para usar como base para mantener o alterar la terapia, así como para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer. En un aspecto de la presente descripción, el sujeto que se somete al régimen se monitoriza para evaluar si el régimen ha dado como resultado una reducción en la población de células madre cancerosas, incluidas las células madre cancerosas resistentes a fármacos en el sujeto.

La cantidad de células madre cancerosas se puede monitorizar/evaluar usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. Las células madre cancerosas pueden monitorizarse, por ejemplo, obteniendo una muestra, tal como una muestra de tejido/tumor, una muestra de sangre o una muestra de médula ósea, de un sujeto, y detectando células madre cancerosas en la muestra. La cantidad de células madre cancerosas en una muestra (que puede expresarse como porcentajes de, por ejemplo, células totales o células cancerosas totales) puede evaluarse detectando la expresión de antígenos en células madre cancerosas. Las técnicas conocidas por los expertos en la técnica pueden usarse para medir estas actividades. La expresión del antígeno se puede analizar, por ejemplo, mediante inmunoensayos incluyendo, pero sin limitación, transferencias western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunofluorescencia, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo y análisis FACS. En dichas circunstancias, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra de ensayo de un sujeto puede determinarse comparando los resultados con la cantidad de células madre en una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de un sujeto que no tiene cáncer detectable) o con un intervalo de referencia predeterminado, o para con el propio paciente en un momento anterior (por ejemplo, antes o durante la terapia).

De acuerdo con la presente descripción, la población de células madre cancerosas en una muestra obtenida de un paciente (por ejemplo, sangre o tejido tumoral) se determina mediante citometría de flujo. Este método explota la expresión diferencial de ciertos marcadores de superficie en las células madre cancerosas en relación con la mayor parte del tumor. Los anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes) se pueden usar para reaccionar con las células en la muestra, y las células se clasifican posteriormente por métodos FACS. En algunos aspectos, se utiliza una combinación de marcadores de superficie celular para determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Por ejemplo, se puede usar la clasificación de células tanto positiva como negativa para evaluar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Las células madre cancerosas para tipos de tumores específicos se pueden determinar mediante la evaluación de la expresión de marcadores en las células madre cancerosas. En ciertos aspectos, los tumores albergan células madre cancerosas y sus marcadores asociados, tal como se expone en la lista a continuación, que proporciona una lista no limitativa de los fenotipos de células madre cancerosas asociados con diversos tipos de cáncer.

55

<b>Tumor</b>	<b>Fenotipo de células madre cancerosas</b>
Leucemia (AML)	CD34+/CD38-
Mama	CD44+/CD24-
Cerebro	CD133+

Leucemia (ALL)	CD34+/CD10-/CD19-
Ovario	CD44+/CD24-
Mieloma múltiple	CD138-/CD34-/CD19+
Leucemia mielógena crónica	CD34+/CD38-
Melanoma	CD20+
Ependimoma	CD133+/RC2+
Próstata	CD44+/ $\alpha$ 2 $\beta$ 1hi/CD133+

Los marcadores de células madre cancerosas adicionales incluyen, pero sin limitación, CD123, CLL-1, combinaciones de SLAM (receptores de la familia de moléculas de activación de señalización de linfocitos; véase Yilmaz et al., "SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity", *Hematopoiesis* 107: 924-930 (2006)), tales como CD150, CD244, y CD48, y los marcadores descritos en la Pat. de Estados Unidos N.º 6.004.528 de Bergstein, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º de serie 09/468.286 pendiente, y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803, y 2007/0036804. Véanse, por ejemplo, la Tabla 1, de la Patente de Estados Unidos N.º 6.004.528 y las Tablas 1, 2, y 3 de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º de serie 09/468.286 y las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803, y 2007/0036804.

En ciertos aspectos de la presente descripción que usa citometría de flujo de una muestra, se puede usar el protocolo de tinte Hoechst para identificar células madre cancerosas en tumores. Brevemente, dos tintes Hoechst de diferentes colores (típicamente rojo y azul) se incuban con células tumorales. Las células madre cancerosas, en comparación con la mayoría de las células cancerosas, sobreexpresan las bombas de flujo de colorante en su superficie que permiten que estas células bombeen el tinte de vuelta a la célula. Las células de la masa tumoral tienen menos de estas bombas y, por lo tanto, son relativamente positivas para el tinte, que puede detectarse mediante citometría de flujo. Típicamente, un gradiente de tinte positivo ("tinte+") frente a tinte negativo ("tinte-") emerge cuando se observa la población total de células. Las células madre cancerosas están contenidas en la población de tinte- o tinte bajo (tintebajo). Para un ejemplo del uso del protocolo de tinción Hoechst para caracterizar una célula madre o población de células madre, véase Goodell et al., "A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux pump capacity in acute myeloid leukemia", *Blood*, 98(4):1166-1173 (2001) y Kondo et al., "Persistence of a small population of cancer stemlike cells in the C6 glioma cell line", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 :781-786 (2004). De esta manera, la citometría de flujo podría usarse para medir la cantidad de células madre cancerosas antes y después de la terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre cancerosas que se deriva de una terapia o régimen dado.

En otros aspectos, una muestra (por ejemplo, una muestra de tumor o tejido normal, muestra de sangre o muestra de médula ósea) obtenida del paciente se cultiva en sistemas *in vitro* para evaluar la población de células madre cancerosas o la cantidad de células madre cancerosas. Por ejemplo, las muestras de tumores se pueden cultivar en agar blando, y la cantidad de células madre cancerosas se puede correlacionar con la capacidad de la muestra para generar colonias de células que se pueden contar visualmente. La formación de colonias se considera una medida sustituta del contenido de células madre y, por lo tanto, puede utilizarse para cuantificar la cantidad de células madre cancerosas. Por ejemplo, con los cánceres hematológicos, los ensayos de formación de colonias incluyen ensayos de células formadoras de colonias (CFC), ensayos de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC) y ensayos de células iniciadoras de cultivo en suspensión (SC-IC). De esta manera, el análisis de formación de colonias o un ensayo relacionado, tal como la perpetuación a largo plazo/paso de una línea celular, podría usarse para medir la cantidad de células madre cancerosas antes y después de la terapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre cancerosas que surge de una terapia o régimen dado.

En un aspecto específico, la cantidad de células madre cancerosas se detecta *in vivo* en un sujeto de acuerdo con un método que comprende las etapas de: (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente de unión al marcador de células madre cancerosas etiquetado que se une específicamente a un marcador de superficie celular que se encuentra en las células madre cancerosas, y (b) detectar el agente marcado en el sujeto después de un intervalo de tiempo suficiente para permitir que el agente marcado se concentre en los sitios donde se expresa el marcador de superficie de la célula madre del cáncer. De acuerdo con este aspecto, el agente de unión a marcador de superficie de células madre cancerosas se administra al sujeto de acuerdo con cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo, por vía parenteral (tal como por vía intravenosa), o por vía intraperitoneal. De acuerdo con este aspecto, la cantidad eficaz del agente es la cantidad que permite la detección del agente en el sujeto. Esta cantidad variará de acuerdo con el tema en particular, la etiqueta utilizada y el método de detección empleado. Por ejemplo, se

entiende en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de imagen usado determinarán la cantidad de agente marcado necesario para detectar el agente en un sujeto usando un medio de imagen. En el caso de un agente radiomarcado para un sujeto humano, la cantidad de agente marcado administrado se mide en términos de radioactividad, por ejemplo, de 5 a 20 milicurios de <sup>99</sup>Tc. El intervalo de tiempo que sigue a la administración del agente marcado que es suficiente para permitir que el agente marcado se concentre en sitios en el sujeto donde se expresa el marcador de superficie de las células madre cancerosas variará dependiendo de varios factores, por ejemplo, el tipo de etiqueta utilizada, el modo de administración, y la parte del cuerpo del sujeto de la que se toma la imagen. En un aspecto particular, el intervalo de tiempo que es suficiente es de 6 a 48 horas, de 6 a 24 horas, o de 6 a 12 horas. En otro aspecto, el intervalo de tiempo es de 5 a 20 días o de 5 a 10 días. La presencia del agente de unión a marcador de superficie de células madre cancerosas marcado puede detectarse en el sujeto usando medios de imagen conocidos en la técnica. En general, los medios de imagen empleados dependen del tipo de etiqueta utilizada. Los expertos en la técnica podrán determinar los medios adecuados para detectar una etiqueta en particular. Los métodos y dispositivos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, tomografía computarizada (TC), exploración de todo el cuerpo, tal como tomografía por emisión de positrones (PET), imágenes de resonancia magnética (MRI), un generador de imágenes que puede detectar y localizar la etiqueta fluorescente y ecografía. En un aspecto específico, el agente de unión al marcador de la superficie de las células madre cancerosas está marcado con un radioisótopo y se detecta en el paciente utilizando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston et al., Pat. de Estados Unidos N.º 5.441.050). En otro aspecto, el agente de unión al marcador de superficie de células madre cancerosas está marcado con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente utilizando un instrumento de exploración sensible a la fluorescencia. En otro aspecto, el agente de unión al marcador de la superficie de las células madre cancerosas se marca con un metal que emite positrones y se detecta en el paciente mediante tomografía por emisión de positrones. En otro aspecto más, el agente de unión al marcador de la superficie de las células madre cancerosas está marcado con una etiqueta paramagnética y se detecta en un paciente utilizando imágenes de resonancia magnética (MRI).

Se puede usar cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* (*ex vivo*) conocido por los expertos en la técnica que pueda detectar y/o cuantificar células madre cancerosas para monitorizar las células madre cancerosas con el fin de evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de meta arsenito de sodio. Los resultados de estos ensayos pueden utilizarse para mantener o alterar la terapia o el régimen contra el cáncer.

### **EJEMPLOS**

Los siguientes materiales y métodos se utilizaron en los ejemplos descritos en el presente documento.

Líneas celulares: Las células DU145wt, DU145/Pac200 y DU145/Doc50 se proporcionaron por el Dr. Hussain, UMGCC, University of Maryland. Las líneas celulares se cultivaron como se recomienda; en medios 1:1 de DMEM/F12 (Invitrogen) complementado con el 5% de FBS, 1% de antibióticos y se hicieron crecer en condiciones estándar a 37°C y el 5% de CO<sub>2</sub>. Los clones resistentes a paclitaxel y docetaxel se mantuvieron bajo la presión de selección de los fármacos.

Fármacos: Se obtuvo KML001 (meta arsenito de sodio) en Sigma-Aldrich Co. (CAS N.º 7784-46-5); se prepararon soluciones madre de fármaco de 50 mM en PBS y las alícuotas se almacenaron a -20°C. Se obtuvo GRN163L en Geron Corp. (Menlo Park, CA). Se preparó una solución madre de fármaco de trabajo de 10 mM en PBS.

Ensayo de proliferación de MTT: Se cultivaron células en crecimiento exponencial y se pusieron en placas de 96 pocillos (1.500/pocillo para DU145wt, y 2.000-3.000/pocillo para DU145/Pac200 y DU145/DocSO). Los fármacos que se probaron se añadieron a concentraciones que variaban de 0,01 µM a 1,00 µM para evaluar su potencial inhibidor de crecimiento. Después de 5 días de exposición continua al fármaco, se añadió a las placas el tinte vital bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La conversión de MTT a formazán púrpura por células viables se midió utilizando un lector de placas Synergy2 a 550 nm y el software Gen5. Las curvas de crecimiento se generaron utilizando Microsoft Excel y se determinó la concentración inhibitoria del crecimiento al 50 (CI50) y al 100%.

Pretratamiento de líneas celulares: Se cultivaron las líneas celulares DU145wt y DU145/Pac200 en medios tratados con KML o GRN163L a sus valores de CI50 y CI100 (en µM) durante 48 (PAC 200) o 72 horas (DU145wt) antes del sometimiento a un ensayo de población lateral.

Ensayo de población lateral: Se contaron las células viables sub-confluentes (106/tubo necesariamente) y se trataron con H33343 o con violeta Dye Cycle (DCV); ambos tintes diferencian entre células madre (población lateral) y células maduras. Se usó el protocolo descrito por Goodell *et al.* (Goodell, M.A. et al., J. Exp. Med., 183:1797-806,

19966). Se analizaron tres muestras cada vez. De las muestras, una fue tratada solo con DCV, otra se trató con DCV y Verapamilo 50 µM (inhibidor de PgP), y la última se trató con DCV y Fumitremorgina C 10 µM (FTC, inhibidor de BCRP). Las muestras se leyeron y se analizaron después utilizando citometría de flujo.

5 Citometría de flujo: Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo BDLSR II. Un láser violeta 405 nM excitó el tinte DCV produciendo longitudes de onda variables basadas en la diferenciación celular. Los detectores a 450/50 (azul) y 680/30 (rojo) interceptaron la longitud de onda emitida y trazaron los datos en el diagrama de dispersión en consecuencia. La tinción de CD44 y Pgp se realizó utilizando anticuerpos marcados con PE (Pgp) o APC (CD44) y sus controles de isotipo siguiendo los procedimientos de rutina para el etiquetado de epítotos.

10

### **EJEMPLO 1**

#### **Identificación de las células madre cancerosas en las líneas celulares de cáncer**

15 En este estudio, las células madre cancerosas (también denominadas población lateral (SP)) y el transportador de casete de unión a ATP (ABC) que definen la SP se identificaron en las siguientes líneas celulares de cáncer de próstata: DU145wt (parental), DU145/ Pac200 (resistente a paclitaxel), y DU145/ Doc50 (resistente a docetaxel).

20 Todas las líneas celulares de cáncer de próstata examinadas: DU145wt, DU145/ Pac200, DU145/ Doc50 presentan una población lateral (Figuras 1, 3, 5). Es importante destacar que se encontró que las células DU145/Pac200 y DU145/Doc50 tienen una población lateral muy grande (Figuras 1, 5) de aproximadamente del 40 al 60% de su población celular total, lo que es compatible con la hipótesis de que las células resistentes a fármacos pueden surgir del cáncer.

### **EJEMPLO 2**

#### **Sensibilidad de las células madre cancerosas resistentes a fármacos y las células cancerosas maduras a meta arsenito de sodio**

30 Líneas celulares resistentes a taxano DU145/Pac200 (altamente resistente a paclitaxel) y DU145/Doc50 (altamente resistente a docetaxel) junto con la línea celular parental DU145, así como a líneas celulares de cáncer resistentes a andrógenos (LNCaP/C81 y LAPC-4/CSS 100) y sus correspondientes líneas celulares parentales sensibles a las hormonas (LNCaP y LAPC-4) se ensayaron para determinar su respuesta al meta arsenito de sodio. Las curvas de crecimiento de los ensayos de MTT estándar mostraron que esas líneas celulares responden con una sensibilidad  
35 similar al meta arsenito de sodio, independientemente de su resistencia al fármaco (Tabla 1).

En cada una de las líneas celulares de próstata se analizó para determinar la existencia de una fracción de células de tipo células madre cancerosas utilizando el análisis de la población lateral de DCV. Las poblaciones laterales (SP) basadas en el flujo de eflujo del tinte violeta Dye Cycle (DCV) se identificaron en las líneas celulares resistentes a fármacos, lo que confirma los resultados anteriores utilizando el tinte Hoechst 33342 para DU145/Doc50 (no  
40 mostrado). La aparición de un SP se basa en la expresión de las bombas de eflujo de fármaco, tal como P-glicoproteína o BCRP, que son responsables de evitar que funcione la terapia citotóxica estándar. Las líneas celulares de cáncer de próstata DU145 resistentes a los agentes quimioterapéuticos estándar paclitaxel y docetaxel tuvieron las SP más altas (Tabla 1). Aunque la línea celular resistente a hormonas LnCaP/C81 y su línea parental  
45 también mostraron una población lateral clara que era suprimible con los inhibidores de la bomba de eflujo de fármaco verapamilo (inhibidor de P-gP) o fumitremorgina C (FTC, inhibidor de BCRP), una población lateral definitiva para LAPC-4 y su derivado resistente a las hormonas no se detectaron por este método. Debido a que las terapias hormonales, por ejemplo, los inhibidores de la síntesis de andrógenos, no son sustratos de las bombas de eflujo de fármacos, estos hallazgos no son sorprendentes.

50

Tabla 1.

Porcentaje de la población del lado de DCV en líneas celulares de cáncer de próstata y en células pretratadas con los inhibidores del transportador de PgP y BCRP (Verapamilo y Fumitremorgina C, FTC), sensibilidad a KML001, longitud del telómero (TRF) y actividad relativa de la telomerasa (TA).						
Línea celular	% de SP	% de SP con Verapamilo	% de SP con FTC	C150 KML001 [µM]	Longitud de TRF [kbp]	Relación TA
DU145	1,04	0,16	0,06	4	2,7	1
DU145/Pac200	55	0,07	56,5	6	3	1,05
DU145Doc50	40,3	1,35	18,35	5	3,4	0,97

LnCaP	0,66	0,12	0,04	4	3	1,18
LnCaP/C81	0,16	0,07	0,11	1	2,6	1,10
LAPC-4	1,54	1,63	2,24	4	6,7	1,27
LAPC-4/CSS100	0,36	0,19	0,30	3	4,9	1,26

**EJEMPLO 3****5 Determinación de la actividad de la telomerasa y la longitud del telómero en células madre cancerosas resistentes a fármacos**

En este estudio, se determinó que las líneas DU145/Pac200 y DU145/Doc50 altamente resistentes a paclitaxel y docetaxel tienen una actividad de telomerasa y una longitud de telómero similares en comparación con sus células DU145 parentales sensibles a fármacos (Tabla 1).

10

Tabla 1.

Valores de CI50 para taxanos y longitud de los telómeros en líneas celulares de cáncer de próstata humano

N.º	Líneas celulares	Paclitaxel		Docetaxel		TA	TRF medio
		CI <sub>50</sub> (µM)	Resistencia (veces)	CI <sub>50</sub> (µM)	Resistencia (veces)	Relación	(kb)
1	DU145 wt	0,0025	1	0,0005	1	1	2,5
2	DU145/Pac <sup>10</sup>	N/A	N/A	N/A	N/A	0,79	3,0
3	DU145/Pac <sup>200</sup>	0,35	140	0,2	400	0,96	2,8
4	Du145 Doc <sup>10</sup>	N/A	N/A	N/A	N/A	1,1	2,2
5	Du145 Doc <sup>50</sup>	1	400	1	2000	0,73	2,8

TA = Actividad de telomerasa

TRF = Fragmento de restricción de telómero

**EJEMPLO 4****15 Los efectos de verapamilo en las células madre cancerosas resistentes a fármacos**

Las SP de las células DU145 resistentes a Pac y Doc se inhibieron por verapamilo, pero no por FTC, lo que sugiere que Pgp (P-glucoproteína) es el transportador de ABC predominante responsable de la aparición de la SP (Figura 1, 5). Esto fue consistente con una alta expresión en la superficie de Pgp por estas células, así como con el marcador de células madre específico para el cáncer de próstata CD44 ((Figura 1B).

20

**EJEMPLO 5****25 Los efectos de las células cancerosas KML001 y GRN163L y las células madre cancerosas**

En este estudio, se compararon los efectos del inhibidor de la telomerasa KML001 (meta arsenito de sodio) en las células DU145wt, DU145/Pac200 y DU145/Doc50 con GRN163L, un inhibidor de la telomerasa que se encuentra actualmente en pruebas clínicas avanzadas.

30 Los ensayos MTT de DU145wt, DU145/Doc50 y DU145/Pac200 tratados con KML001 o GRN163L revelaron una marcada inhibición del crecimiento (Tabla 1, Figura 1, 4). KML001 fue igualmente eficaz en células DU145 parentales resistentes a fármacos (Tabla 1, Figura 1D)

**EJEMPLO 6**

35

**Los efectos del meta arsenito de sodio y GRN 163 L sobre las células madre cancerosas**

En este estudio, se investigó la capacidad del meta arsenito de sodio y GRN163L para erradicar la población lateral de DU145wt y DU145/Pac200 cuando se trataron previamente a su CI100 durante 48-72 horas.

40

Este estudio demostró que las células DU145 y DU145/Pac200 tratadas previamente con KML001 a una concentración de fármaco que inhibe el crecimiento de estas células al 100%, fueron capaces de reducir drásticamente la SP (Figura 3B, 5D). Sin embargo, las células maduras (no SP) también fueron erradicadas. El inhibidor específico (solo telomerasa) GRN163L se usó para validar los efectos del meta arsenito de sodio en la SP.

GRN 163 L también redujo notablemente la SP, pero no pudo destruir las células no SP en la misma medida que KML001 (Figura 5).

En general, los datos demuestran que el meta arsenito de sodio es eficaz en la erradicación tanto de células 5 maduras de cáncer resistentes a fármacos como de células madre cancerosas resistentes a fármacos.

### **EJEMPLO 7**

#### **Separación de la SP en la población de células cancerosas resistentes a fármacos/respuesta a KML001**

10

Todas las líneas celulares de cáncer de próstata, líneas celulares de cáncer resistentes a taxanos y resistentes a andrógenos y células parentales que responden a hormonas responden con una sensibilidad similar a KML001 (CI50 de 1-6  $\mu$ M). Las líneas celulares de cáncer que eran resistentes a paclitaxel y docetaxel se analizaron utilizando un ensayo de células madre clonigénicas de tumores bien establecidos para su respuesta a KML001.

15

(Figura 6) El ensayo permite que solo la población de células madre cancerosas crezca en una matriz de agar blando debido a su capacidad de auto renovación. Por lo tanto, este ensayo prueba específicamente la sensibilidad de la población de células madre a un agente anticanceroso.

20

La eficiencia de la siembra en placas de las células (2% para DU145 y DU145/Pac200) fue similar a la población de células madre previamente informada determinada en el ensayo de población lateral (1% para DU145 y 50% para DU145/Pac200). Se observó una sensibilidad similar a KML001 para la línea celular parental y resistente a paclitaxel, como se muestra en una reducción de la capacidad de formación de colonias en presencia de KML001. Una CI50 similar (6  $\mu$ M) para las líneas celulares en este ensayo se derivó como un ensayo MTT estándar realizado previamente (4  $\mu$ M para DU145 y 6  $\mu$ M para DU145/Pac200).

25

Las líneas celulares resistentes a taxano tuvieron las SP más altas, mientras que la línea celular LAPC-4 sensible a hormonas y su derivado resistente a hormonas mostraron una SP menos definitiva que fue suprimible con los inhibidores del eflujo de fármaco, verapamilo (inhibidor de Pgp) y fumitremorgina c (FTC, inhibidor de BCRP). La línea celular de SP positiva, DU145, se ensayó para detectar la presencia de CD44 y CD133 y los resultados 30 mostraron que el 0,46% tenía ambos marcadores (datos no mostrados).

35

La SP se separó de la mayor parte de la masa tumoral y las curvas de crecimiento de un ensayo MTT estándar mostraron que ambas fracciones, la fracción SP positiva (SP+) y negativa (SP-) similar a las células madre cancerosas, responden con una sensibilidad similar a KML001. (Figura 7)

40

### **EJEMPLO 8**

#### **Determinación de la longitud del telómero, actividad de la telomerasa y actividad de la hTERT**

40

Como se muestra anteriormente (Ejemplo 3), la fracción similar a células madre cancerosas identificada con el ensayo de SP presentó una actividad de telomerasa más alta que la fracción de la mayor parte de las células. Los estudios preliminares indican que el nivel de transcrito de ARNm de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) es similar para ambas poblaciones. (Figura 8A), que puede indicar que la mayor actividad de la telomerasa de la población similar a la de las células madre cancerosas puede ser el resultado de la estimulación de las vías de señalización de las proteínas asociadas a la telomerasa. Los resultados preliminares en la línea celular 45 DU145/Pac200 sin clasificar indican que el tratamiento con KML001 disminuye significativamente el nivel de transcripción de hTERT a la CI50 y la CI100 después de 72 horas. (Figura 8B)

50

La bomba de eflujo de fármaco (Pgp) se expresa funcionalmente (en la membrana) en la mayoría de las células de las líneas celulares de cáncer de próstata resistentes a taxano, lo que se espera ya que la SP de esas líneas celulares fue suprimible con el inhibidor de la bomba de eflujo de fármaco verapamilo. El tratamiento con KML001 a CI50 durante 72 horas redujo la población de células Pgp positiva, lo que corrobora los resultados del ensayo clonogénico y de SP.

55

### **EJEMPLO COMPARATIVO 9**

El efecto del cisplatino en la línea celular de cáncer de próstata resistente a paclitaxel DU145/Pac200, así como la línea celular parental DU145, se examinó en un MTT estándar. Los resultados muestran que ambas líneas celulares responden con una sensibilidad similar (CI50 de 3 y 4  $\mu$ M, respectivamente). Los resultados preliminares indican un

efecto sinérgico entre cisplatino y KML001 en las líneas celulares parentales y resistentes a paclitaxel (resultados no mostrados).

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a paclitaxel o resistente a docetaxel que comprende (1) una composición que comprende meta arsenito de sodio y (2) una  
5 composición que comprende paclitaxel o docetaxel, respectivamente.
2. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a paclitaxel o resistente a docetaxel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición que comprende meta arsenito de sodio se formula para administración oral, parenteral o intraperitoneal.  
10
3. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a paclitaxel o resistente a docetaxel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer de próstata es resistente a docetaxel.
4. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a paclitaxel o  
15 resistente a docetaxel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer de próstata es resistente a paclitaxel.
5. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a paclitaxel o resistente a docetaxel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición que comprende meta arsenito de sodio se formula para administración oral.  
20
6. El agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a paclitaxel o resistente a docetaxel de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición que comprende meta arsenito de sodio comprende una dosis unitaria de 0,1 a 20 mg de meta arsenito de sodio.

**A.**

**Población lateral**

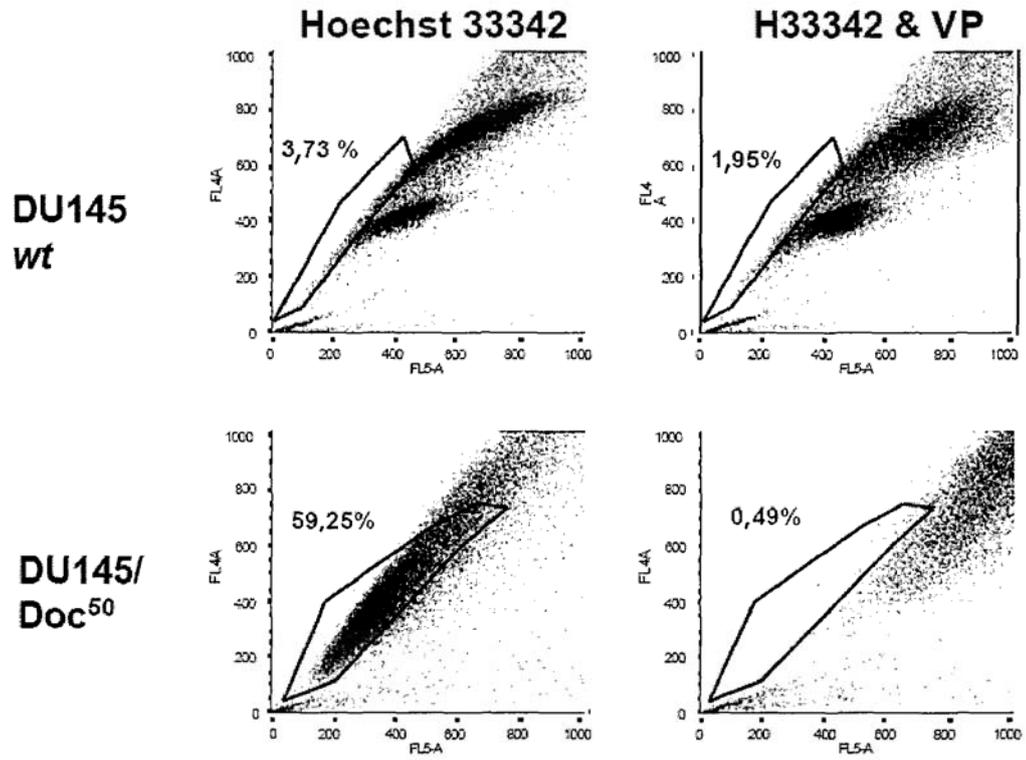
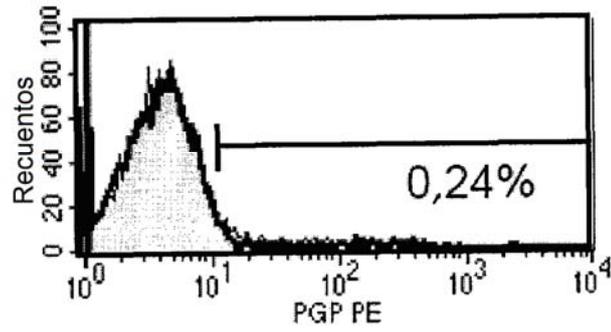


Figura 1A

**B.**

**Pgp**

**DU145 wt**



**DU145/ Doc<sup>50</sup>**

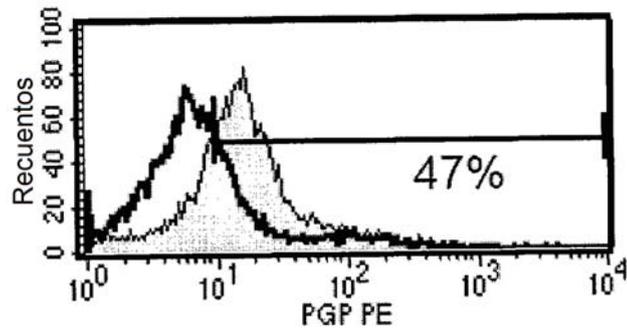
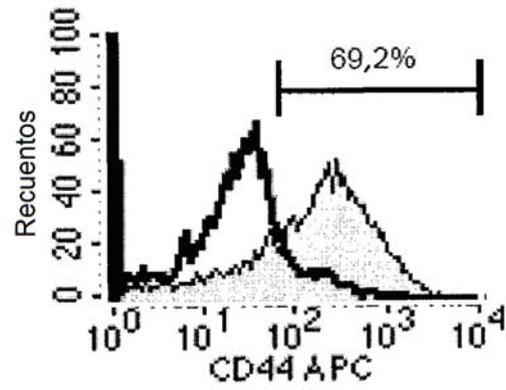


Figura 1B

C.

CD44

DU145 wt



DU145/ Doc<sup>50</sup>

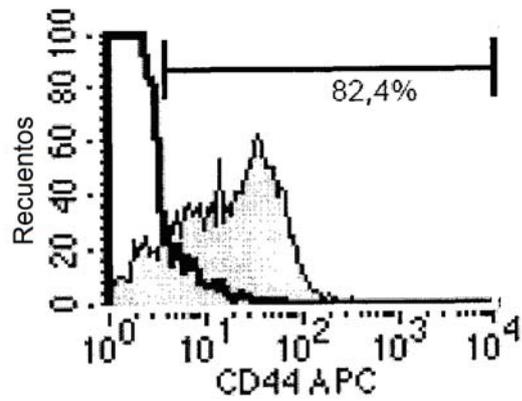


Figura 1C

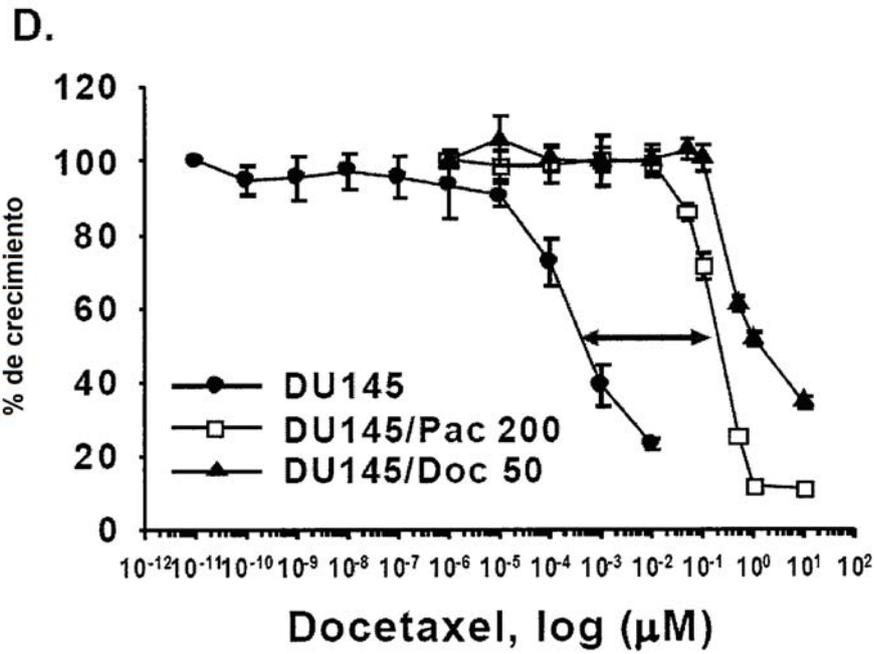


Figura 1D

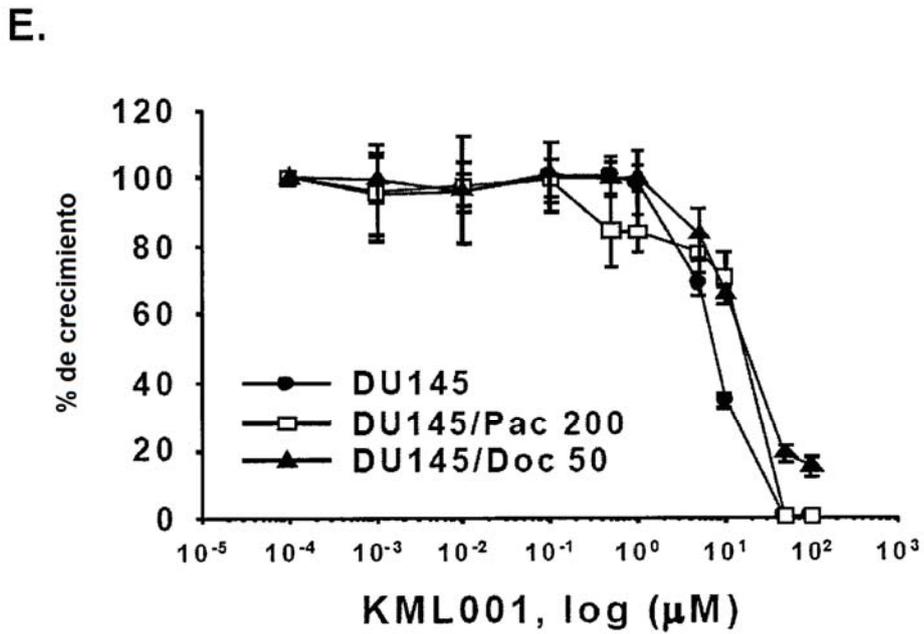


Figura 1E

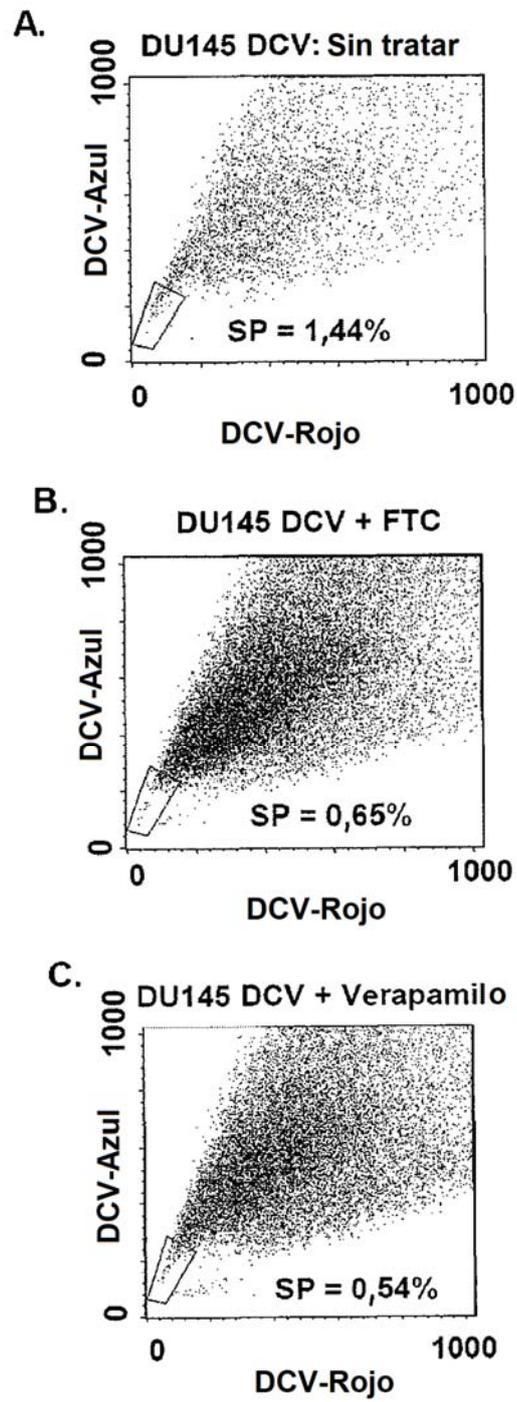


Figura 2

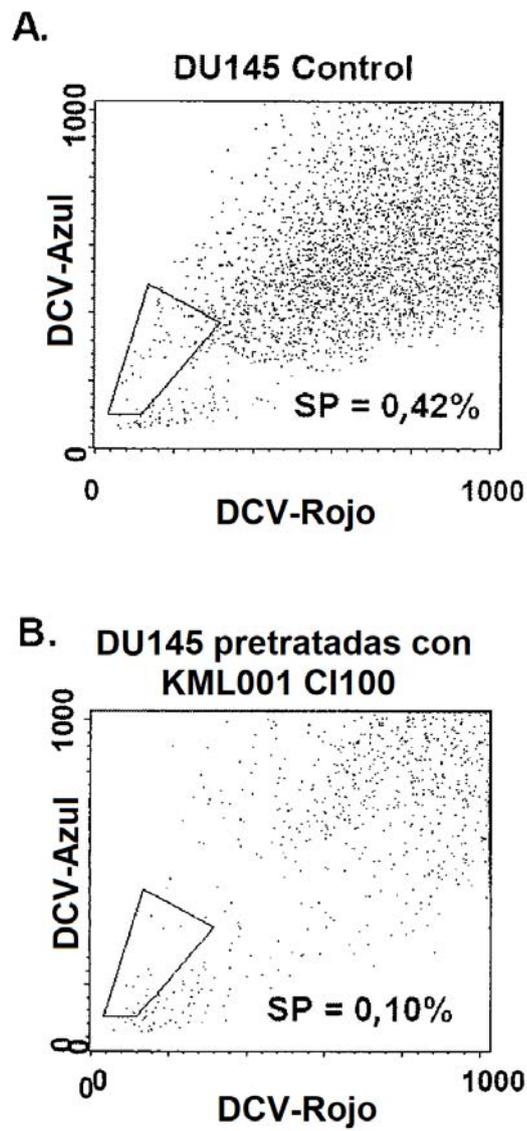


Figura 3

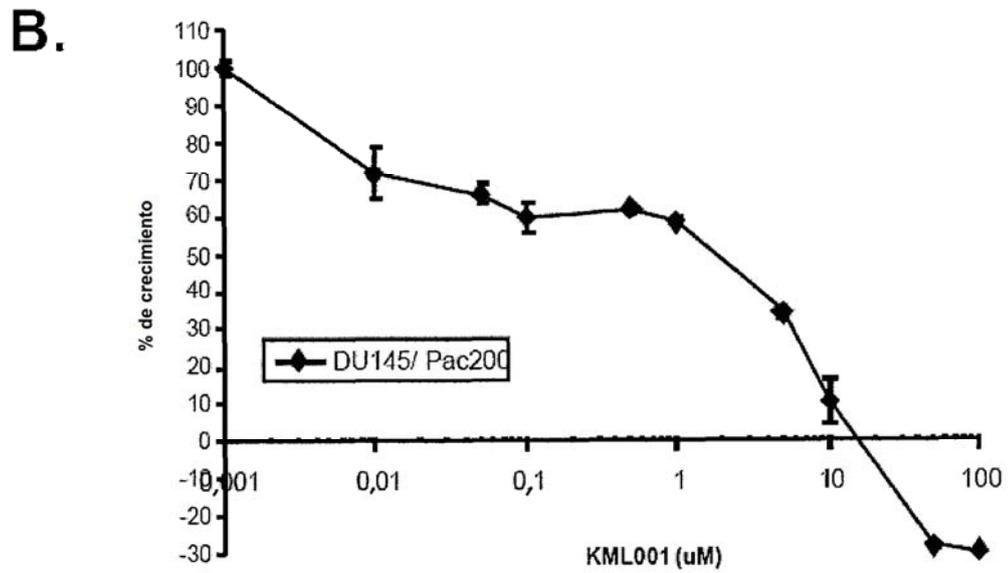
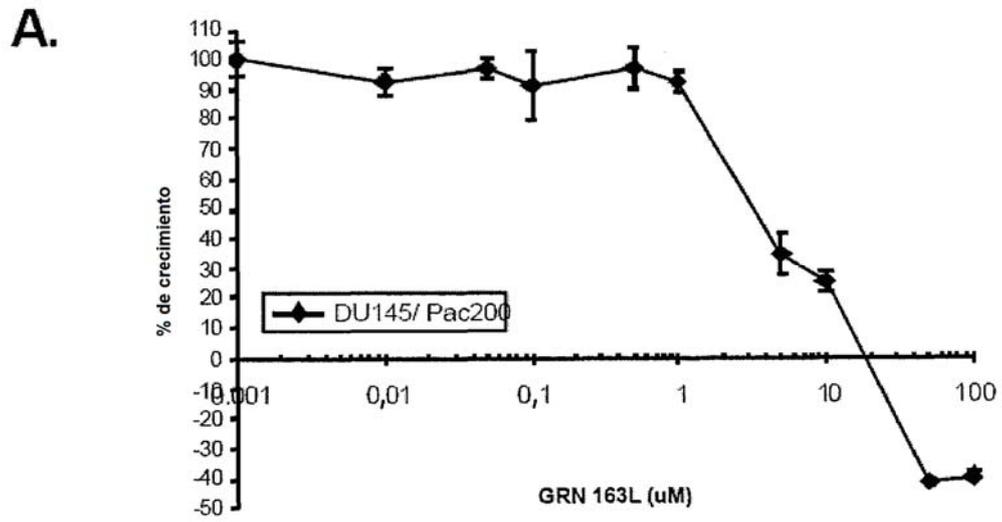


Figura 4

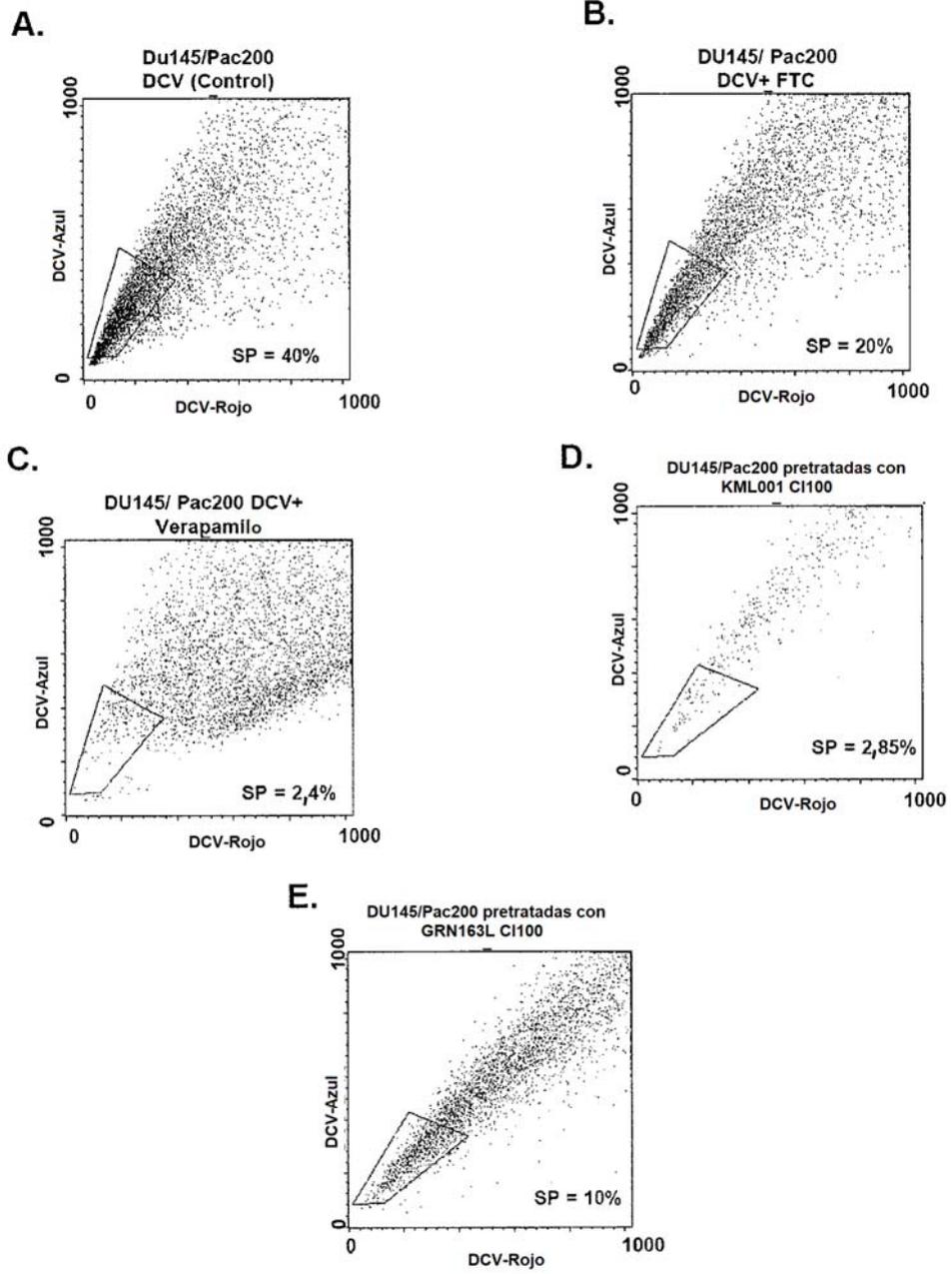


Figura 5

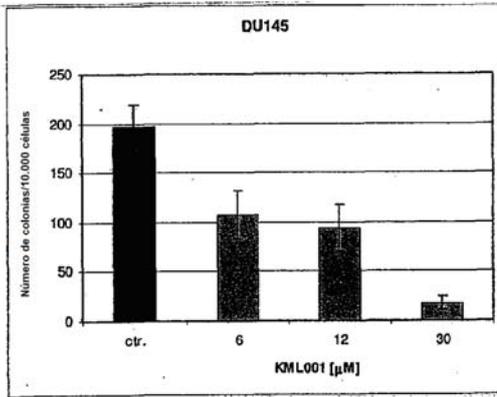


FIGURA 6A

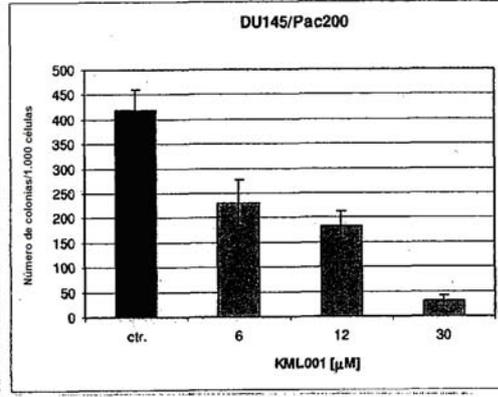


FIGURA 6B

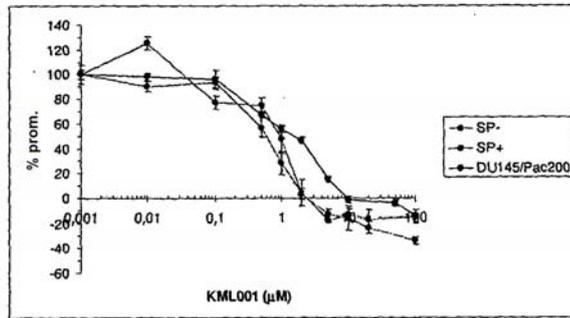


FIGURA 7

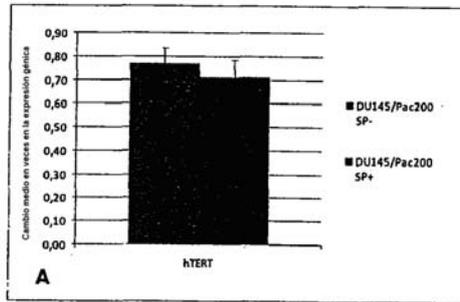


FIGURA 8A

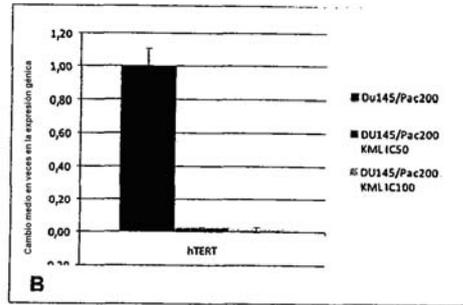


FIGURA 8B