

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 072**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007 E 19159793 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3520806**

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

30 Prioridad:

07.09.2006 US 84347106 P

01.06.2007 US 93277207 P

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

13.11.2024

73 Titular/es:

SCOTT & WHITE MEMORIAL HOSPITAL (100.0%)

2401 South 31st Street

Temple, TX 76508, US

72 Inventor/es:

FRANKEL, ARTHUR E.

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 2 987 072 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

5 1. Campo de la invención

La presente invención es una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina (IL)-3 humana-toxina diftérica para utilización en un método para tratar la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) en un humano, según las reivindicaciones adjuntas. Otras realizaciones y aspectos dados a conocer en la presente memoria relativos a métodos, conjugados o composiciones *per se* no están abarcados por las presentes reivindicaciones, pero se mantienen en la presente memoria, ya que son útiles para comprender e implementar la presente invención.

La presente invención se refiere a métodos para dirigirse a células que expresan receptor de interleucina-3 y, en particular, inhibir el crecimiento de dichas células utilizando un conjugado de toxina diftérica-interleucina-3 humana (DT-IL3) que es tóxico para las células que expresan el receptor de interleucina-3. En realizaciones preferidas, el conjugado DT-IL3 es una construcción recombinante en donde se inserta ADN que codifica IL-3, en lugar del dominio de unión a receptor de la toxina diftérica (las regiones catalítica y de translocación de la toxina diftérica permanecen intactas), que, cuando se traduce, produce una proteína que comprende los aminoácidos 1-388 de toxina diftérica fusionada mediante un enlazador peptídico a interleucina-3 humana de longitud completa. En determinadas realizaciones, los métodos descritos se refieren a la administración de un conjugado DT-IL3 para inhibir el crecimiento de células cancerosas y/o células madre cancerosas en humanos, las cuales expresan una o más subunidades del receptor de interleucina-3. Las células ejemplares incluyen las células cancerosas y células madre cancerosas de leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico. Se describen métodos que se refieren al purgado *ex vivo* de médula ósea o sangre periférica para eliminar células que expresan una o más subunidades del receptor de interleucina-3 de modo tal que la médula ósea o sangre periférica purgada sea adecuada, por ejemplo, para el trasplante de células madre autólogo de vuelta al paciente para restaurar la función hematopoyética (por ejemplo, como puede ser necesario después quimioterapia en dosis altas para el cáncer).

30 2. Antecedentes de la invención

2.1 Terapia contra el cáncer

El cáncer es una de las afecciones de salud más significativas. El documento Datos y cifras sobre el cáncer de la Sociedad Estadounidense contra el Cáncer, 2003, predice que más de 1,3 millones de estadounidenses recibirán un diagnóstico de cáncer este año. En los Estados Unidos, el cáncer ocupa el segundo lugar, después de las cardiopatías, en cuanto a mortalidad, representando una de cada cuatro muertes. En 2002, los Institutos Nacionales de Salud estadounidenses estimaron que los costes totales del cáncer ascendían a 171 600 millones de dólares estadounidenses, con 61 000 millones de dólares estadounidenses en gastos directos. En general, se espera que la incidencia del cáncer aumente a medida que la población de EE. UU. envejece, lo que aumentará aún más el impacto de esta afección. Las pautas de tratamiento actuales para el cáncer, establecidas en los años 70 y 80, no han cambiado drásticamente. Estos tratamientos, que incluyen quimioterapia, radiación y otras modalidades que incluyen terapias dirigidas más recientes, han demostrado un beneficio de supervivencia global limitado cuando se utilizan en cánceres frecuentes en estadio más avanzado, dado que, entre otras cosas, estas terapias se dirigen principalmente a la masa tumoral.

Más específicamente, hasta la fecha, el diagnóstico y las terapias contra el cáncer convencionales han tratado de detectar y erradicar selectivamente células neoplásicas que son en gran medida de crecimiento rápido (es decir, células que forman la masa tumoral). A menudo, las pautas oncológicas estándar se han diseñado en gran medida para administrar la dosis más alta de irradiación o de un agente quimioterapéutico sin toxicidad excesiva, es decir, a menudo denominada la “dosis máxima tolerada” (DMT) o “nivel sin efecto adverso observado” (NOAEL). Muchas quimioterapias contra el cáncer convencionales (por ejemplo, agentes alquilantes, tales como ciclofosfamida, antimetabolitos, tales como 5-fluorouracilo, y alcaloides vegetales, tales como vincristina) y radioterapias convencionales ejercen en gran medida sus efectos tóxicos sobre las células cancerosas interfiriendo con mecanismos celulares implicados en el crecimiento celular y la replicación del ADN. Los protocolos quimioterapéuticos también implican a menudo la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos en un intento de aumentar la eficacia del tratamiento. A pesar de la disponibilidad de un gran abanico de agentes quimioterapéuticos, estas terapias tienen muchos inconvenientes (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, “Principles Of Cancer Patient Management”, en Scientific American Medicine, volumen 3, Rubenstein y Federman, eds., capítulo 12, sección X). Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos son notoriamente tóxicos debido a efectos secundarios inespecíficos sobre células de crecimiento rápido, ya sean normales o malignas; por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos causan efectos secundarios significativos y, a menudo, peligrosos, que incluyen depresión de la médula ósea, inmunosupresión y malestar gastrointestinal, etc.

Otros tipos de terapias contra el cáncer tradicionales incluyen cirugía, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia antiangiogénica, terapia dirigida (por ejemplo, terapia dirigida a una diana del cáncer, tal como Gleevec® y otros inhibidores de tirosina cinasas, Velcade®, Sutent®, *et al.*), y radioterapia para erradicar células neoplásicas en un

paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, “Principles of Cancer Patient Management”, en Scientific American: Medicine, volumen 3, Rubenstein y Federman, eds., capítulo 12, sección IV). Todas estas estrategias pueden plantear inconvenientes significativos para el paciente, que incluyen una falta de eficacia (en términos de resultado a largo plazo (por ejemplo, debido al fracaso a la hora de dirigirse a células madre cancerosas) y toxicidad (por ejemplo, debido a efectos inespecíficos sobre tejidos normales)). Por consiguiente, se necesitan nuevas terapias para mejorar las expectativas a largo plazo de los pacientes con cáncer.

2.2 Células madre cancerosas

Las células madre cancerosas comprenden una subpoblación singular (a menudo de 0,1-10 %, más o menos) de un tumor que, con respecto al 90 % restante, más o menos, del tumor (es decir, la masa tumoral), son más tumorigénicas, de crecimiento relativamente más lento o latentes y, a menudo, relativamente más quimiorresistentes que la masa tumoral. Dado que las terapias y pautas convencionales han sido diseñadas, en gran parte, para atacar a células que proliferan rápidamente (es decir, las células cancerosas que componen la masa tumoral), las células madre cancerosas que a menudo son de crecimiento lento pueden ser relativamente más resistentes a terapias y pautas convencionales que la masa tumoral de crecimiento más rápido. Las células madre cancerosas pueden expresar otras características que las hacen relativamente quimiorresistentes, tales como resistencia a múltiples fármacos y vías antiapoptóticas. Lo mencionado anteriormente constituiría un motivo clave para el fracaso de las pautas de tratamiento oncológicas estándar a la hora de garantizar un beneficio a largo plazo en la mayoría de los pacientes con cánceres en estadio avanzado, es decir, el fracaso a la hora de dirigirse adecuadamente a células madre cancerosas y erradicarlas. 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 componen la masa tumoral).

Se han identificado células madre cancerosas en un gran abanico de tipos de cáncer. Por ejemplo, Bonnet *et al.*, utilizando citometría de flujo, pudieron aislar las células de leucemia que portaban el fenotipo específico CD34+ CD38– y, posteriormente, demostrar que son estas células (que comprenden <1 % de una leucemia determinada), a diferencia del 99+ % o más restante de la masa leucémica, que pueden reproducir la leucemia desde el momento en que se originó cuando se transfieren 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, se encontraron estas células madre cancerosas como <1 en 10 000 células de leucemia, pero esta población de baja frecuencia pudo iniciar y transferir en serie una leucemia humana a ratones con inmunodeficiencia combinada grave/diabéticos no obesos (NOD/SCID) con el mismo fenotipo histológico que en el tumor original.

Cox *et al.* identificaron pequeñas subfracciones de células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) humana que tenían los fenotipos CD34+/CD10– y CD34+/CD19–, y eran capaces de injertar tumores de LLA en ratones inmunocomprometidos, es decir, las células madre cancerosas. Por el contrario, no se observó ningún injerto de los ratones utilizando masa de LLA, a pesar de, en algunos casos, inyectar 10 veces más células. Véase Cox *et al.*, “Characterization of agudelymphoblastic leukemia progenitor Cells”, Blood 104(19): 2919-2925 (2004).

Se encontró que el mieloma múltiple contenía pequeñas subpoblaciones de células que eran CD138– y, con respecto a la gran población de células de mieloma CD138+ de la masa, tenían mayor potencial clonogénico y tumorigénico. Véase Matsui *et al.*, “Characterization of clonogenic multiple myeloma cell”, Blood 103(6): 2332. Los autores concluyeron que la subpoblación CD138– de mieloma múltiple 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 autorrenovarse y reproducir gliomas en ratones inmunocomprometidos. Véase Kondo *et al.*, “Persistence of a small poblation of cancer stem-like cell line in the C6 glioma cell line”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:781-786 (2004). En este estudio, Kondo *et al.* determinaron que las líneas de células cancerosas contienen una población de células madre cancerosas que confieren la capacidad de la línea para injertar ratones inmunodeficientes.

Se demostró que los cánceres de mama contienen una pequeña población de células con características de células madre (que portan marcadores de superficie CD44+CD24^{low lin–}). Véase Al-Hajj *et al.*, “Prospective Identification of tumorigenic blood cancer cells”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983-3988 (2003). Tan solo 200 de estas células, que corresponden a 1-10 % de la población de células tumorales total, pueden formar tumores en ratones NOD/SCID. Por el contrario, la implantación de 20 000 células que carecían de este fenotipo (es decir, la masa tumoral) no pudo hacer que el tumor creciera de nuevo.

Se encontró que una subpoblación de células derivadas de tumores de próstata humanos se autorrenovaba y reproducía el fenotipo del tumor de próstata del que se derivaron, constituyendo de ese 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 autorrenovarse. En cultivo, la subpoblación formó

esferas, mientras que la fracción de células más diferenciadas de las lesiones fue más adherente. Además, cuando se injertó en ratones, la subpoblación que contenía células similares a esferas fue más tumorigénica que las células adherentes. Véase Fang *et al.*, “A Tumorigenic Subpoblation with Stem Cell Properties in Melanomas”, *Cancer Res* 65(20): 9328-9337 (2005).

Singh *et al.* identificaron células madre de tumores cerebrales. Cuando se aíslan y trasplantan en ratones atímicos, las células madre cancerosas CD133+, a diferencia de las células de masa tumoral CD133-, forman tumores que a continuación se pueden trasplantar en serie. Véase 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 contra el cáncer convencionales se dirigen a células que proliferan rápidamente (es decir, células que forman la masa tumoral), se cree que estos tratamientos son relativamente ineficaces a la hora de dirigirse a las células madre cancerosas y alterarlas. De hecho, se ha demostrado que las células madre cancerosas, que incluyen las células madre de leucemia, son relativamente resistentes a las terapias quimioterapéuticas convencionales (por ejemplo, Ara-C, daunorubicina), así como a terapias dirigidas más recientes (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 1 a continuación.

Tabla 1:

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

Por ejemplo, las células madre leucémicas son de crecimiento relativamente lento o latentes, expresan genes de resistencia a múltiples fármacos, y utilizan otros mecanismos o características antiapoptóticos que contribuyen a su quimiorresistencia. Véase Jordan *et al.*, “Targeting the most critical cells: approaching leukemia therapy as a problem in stem cell biology”, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2: 224-225 (2005). Además, las células madre cancerosas, en virtud de su quimiorresistencia, pueden contribuir al fracaso del tratamiento, y también pueden persistir en un paciente después de la remisión clínica y, por lo tanto, estas células madre cancerosas restantes pueden contribuir 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 a células madre cancerosas proporcione mejores resultados a largo plazo para los pacientes con cáncer. Por consiguiente, para lograr este objetivo, se necesitan nuevos agentes y/o pautas terapéuticos diseñados para dirigirse a células madre cancerosas.

2.3 Leucemia mieloide aguda

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

2.4 Síndrome mielodisplásico

Hay aproximadamente 20 000 casos nuevos de síndrome mielodisplásico (SMD) cada año en los EE. UU. Los pacientes con síndromes mielodisplásicos tienen habitualmente recuentos de células sanguíneas bajos en al menos uno o más de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Tras el examen, normalmente se encuentra que la médula ósea es displásica o hiperplásica, que significa que hay demasiadas células madre sanguíneas que funcionan mal en la médula. Un pequeño porcentaje de pacientes con SMD tiene médula ósea hipoplásica, que significa que hay demasiado pocas células madre sanguíneas en la médula, lo que hace que la enfermedad parezca similar a la anemia

aplásica. Prácticamente la mitad de las personas con SMD no tienen síntomas en el momento del diagnóstico. Cuando se presentan signos y síntomas, estos pueden incluir anemia, debilidad, fatiga, cefalea, hematomas, aumento de las hemorragias, exantema, fiebre, llagas en la boca y enfermedad persistente. El SMD se presenta con una frecuencia cada vez mayor en personas de edad avanzada, pero también se puede presentar en niños. En menos de un tercio de los pacientes, el SMD progresa con el tiempo hasta convertirse en leucemia aguda. La edad promedio de diagnóstico es 70 años. Los tratamientos para el SMD pueden variar considerablemente, en función del tipo de SMD, los antecedentes del paciente, y la edad y capacidad para tolerar determinadas pautas de tratamiento. Las opciones de tratamiento incluyen el tratamiento sintomático, agentes relacionados con la quimioterapia, y el trasplante de células madre (que habitualmente solo se utiliza en pacientes menores de 50 años). Sin embargo, la tasa de remisión para los tratamientos existentes es relativamente baja y se necesitan nuevas terapias.

2.5 Interleucina-3

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

2.6 Toxina diftérica

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

2.7 Conjugados de toxina diftérica recombinantes

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

despliega y es escindido por furina en la vesícula y, a continuación, el extremo C del dominio catalítico se transfiere a través del canal y une β -COP. La proteína disulfuro isomerasa reduce el enlace del dominio catalítico con el resto de DT y el péptido pasa al citosol. Hsp90 ayuda al repliegamiento. El fragmento de DT ADP-ribosila a continuación el factor de elongación 2, lo que conduce a inactivación de la síntesis de proteínas y muerte celular (Figura 2). Véase Ratts *et al.*, "A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 15635-15640 (2005). Se han expresado, purificado y probado en cultivos celulares varios conjugados de DT recombinantes, que utilizan una forma truncada de DT, y se ha demostrado toxicidad celular selectiva. Una de dichas toxinas recombinantes es el conjugado DT₃₈₈IL-3, en donde la DT truncada mantiene su dominio catalítico y de translocación, pero no su dominio de unión celular.

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

3. Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina (IL)-3 humana-toxina diftérica para utilización en un método para tratar la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) en un humano, en donde dicho método comprende administrar dicho conjugado de IL-3 humana y toxina diftérica a dicho humano, según las reivindicaciones. En un aspecto preferido de esta realización, se inhibe el crecimiento de células de LMMC.

En esta o cualquiera de las realizaciones de la presente invención, el conjugado de interleucina-3-toxina diftérica puede comprender interleucina-3 humana de longitud completa madura (que carece del péptido señal) conectada mediante un enlace covalente a toxina diftérica. Preferiblemente, la toxina diftérica se modifica de modo tal que se suprime el dominio de unión a la superficie de las células. Por ejemplo, el conjugado es un conjugado químico en el que la porción de toxina diftérica (los dominios catalítico y de translocación de toxina diftérica) y la porción de interleucina-3 están enlazadas químicamente entre sí, ya sea directamente o a través de un enlazador químico. Opcionalmente, el conjugado es un recombinante genético en el que el conjugado es expresado como un solo polipéptido. Cuando el conjugado es un conjugado recombinante, el conjugado traducido comprende preferiblemente los dominios catalítico y de translocación de toxina diftérica enlazada mediante un enlace peptídico a interleucina-3 humana. De la forma más preferible, el conjugado comprende los aminoácidos 1-388 de toxina diftérica enlazada mediante un enlazador peptídico a interleucina-3 humana.

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

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

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

Se describe un método para tratar, prevenir y/o controlar una enfermedad o trastorno que presenta, o está caracterizada por, expresión de receptor de interleucina-3, que comprende administrar a un humano con necesidad de dicho tratamiento o prevención una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar, prevenir o controlar la enfermedad o trastorno y un vehículo farmacéuticamente aceptable, con la condición de que la enfermedad o trastorno no sea leucemia mieloide aguda, y en donde las células expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta realización, la expresión de receptor de interleucina-3 puede ser sobreexpresión de una o más subunidades del receptor de interleucina-3 sobre células que normalmente expresan el receptor de interleucina-3. En otro aspecto, la expresión de receptor de interleucina-3 puede ser expresión inapropiada de receptor de interleucina-3 sobre células que normalmente no expresan una o más subunidades del receptor de interleucina-3. En todavía otro aspecto, la enfermedad o trastorno presenta, o está caracterizada por, presencia o presencia excesiva de un tipo de célula que expresa una o más subunidades del receptor de interleucina-3. Las enfermedades o trastornos ejemplares que se pueden tratar en esta realización de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o trastornos alérgicos, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, enfermedades o trastornos inflamatorios, o cánceres que no son leucemia mieloide aguda. En aspectos donde la enfermedad o trastorno es cáncer, el cáncer puede ser resistente, o resistente a múltiples fármacos. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno es SMD.

También se describe un método para tratar, prevenir y/o controlar una enfermedad o trastorno que presenta, o está caracterizada por, expresión de receptor de interleucina-3, que comprende administrar a un humano con necesidad de dicho tratamiento, prevención y/o control una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar, prevenir y/o controlar la enfermedad o trastorno y un

vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta realización, las células expresan las subunidades tanto alfa como beta del receptor de interleucina-3. En aspectos específicos de esta realización, el conjugado se puede administrar en una dosis de 4 µg/kg al día o más. En otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg al día a aproximadamente 20 µg/kg al día. En todavía otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg al día a aproximadamente 9 µg/kg al día. En todavía otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente 4 µg/kg al día a aproximadamente 12,5 µg/kg al día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado se puede administrar en una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg al día, o en una dosis de aproximadamente 7,1 µg/kg al día, o en una dosis de aproximadamente 9,4 µg/kg al día, o en una dosis de aproximadamente 12,5 µg/kg al día. En un aspecto específico, el conjugado se puede administrar en una dosis que es la dosis máxima tolerada sin toxicidad excesiva, o por debajo de la misma. En un aspecto de esta realización, la expresión de receptor de interleucina-3 puede ser sobreexpresión de receptor de interleucina-3 sobre células que normalmente expresan el receptor de interleucina-3. En otro aspecto, la expresión de receptor de interleucina-3 puede ser expresión inapropiada de receptor de interleucina-3 sobre células que normalmente no expresan el receptor de interleucina-3. En todavía otro aspecto, la enfermedad o trastorno presenta, o está caracterizada por, presencia o presencia excesiva de un tipo de célula que expresa el receptor de interleucina-3. Las enfermedades o trastornos ejemplares que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o trastornos alérgicos, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, enfermedades o trastornos inflamatorios, o cánceres (que incluyen, sin limitación, leucemia mieloide aguda). En aspectos donde la enfermedad o trastorno es cáncer, el cáncer puede ser resistente, o resistente a múltiples fármacos. En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno es SMD.

Se describe además un método para tratar, prevenir y/o controlar el cáncer, el cual comprende administrar a un humano con necesidad de dicho tratamiento, prevención y/o control una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar, prevenir y/o tratar el cáncer y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células cancerosas expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, con la condición de que el cáncer no sea leucemia mieloide aguda. Se describe un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende administrar a un humano con necesidad de dicho tratamiento o prevención una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar o prevenir el cáncer y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células madre cancerosas expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, con la condición de que el cáncer no sea leucemia mieloide aguda.

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

En otros aspectos de estas realizaciones, el paciente humano puede estar en un estado de remisión del cáncer. En todavía otros aspectos, el paciente humano ha sido tratado previamente con el conjugado, ha sido tratado previamente con agentes quimioterapéuticos convencionales o ha recibido radioterapia. En todavía otro aspecto, se puede administrar al paciente humano, de forma simultánea al tratamiento con compuestos de la presente invención, un agente quimioterapéutico convencional o se le puede someter a radioterapia. En otros aspectos, el paciente humano no tiene niveles detectables de anticuerpos antitoxina diftérica antes de la administración de un conjugado. En todavía otro aspecto, el método comprende además administrar un agente quimioterapéutico convencional. En aspectos particulares, el cáncer es un cáncer no hematológico. Además, el cáncer puede ser resistente, o resistente a múltiples fármacos.

En un aspecto específico, los métodos de esta realización pueden comprender además monitorizar la cantidad de células cancerosas o células madre cancerosas que expresan la subunidad alfa (en algunas realizaciones, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3 en una muestra derivada del humano después de la administración de un conjugado, y determinar un ciclo adicional de tratamiento basándose en la cantidad de células

cancerosas o células madre cancerosas que expresan la subunidad alfa (en algunas realizaciones, las subunidades alfa y beta) presentes en la muestra en comparación con una muestra de referencia o una muestra de células cancerosas o células madre cancerosas obtenidas del humano antes de la administración del conjugado o durante la misma.

También se describe un método para tratar, prevenir y/o controlar la leucemia mieloide, que comprende administrar a un humano con necesidad de dicho tratamiento, prevención y/o control una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar o prevenir la leucemia mieloide y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado se administra en una dosis de más de 4 µg/kg, y en donde las células de leucemia mieloide expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3. En particular, la leucemia mieloide puede ser leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, o síndrome mielodisplásico. En algunos casos, la leucemia mieloide puede ser resistente y/o resistente a múltiples fármacos. En un aspecto de esta realización, las células de leucemia mieloide pueden expresar las subunidades tanto alfa como beta del receptor de interleucina-3.

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

En otros aspectos de estas realizaciones, el paciente humano puede estar en un estado de remisión de la leucemia mieloide. En todavía otros aspectos, el paciente humano ha sido tratado previamente con el conjugado, ha sido tratado previamente con agentes quimioterapéuticos convencionales o radioterapia. En todavía otro aspecto, se puede administrar simultáneamente al paciente humano un agente quimioterapéutico convencional o radioterapia. En todavía otro aspecto, se administra al paciente humano el conjugado 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses después de recibir quimioterapia convencional. En otros aspectos, el paciente humano tiene niveles bajos o no detectables de anticuerpos antitoxina diftérica antes de la administración de un conjugado. En todavía otro aspecto, el método comprende además administrar un agente quimioterapéutico convencional.

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

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

Se describe un método para prevenir una recidiva del cáncer en un humano tratado previamente para el cáncer, que comprende administrar a un humano con necesidad de dicha prevención, que había sido tratado previamente para el cáncer, una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recidiva del cáncer y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células cancerosas o las células madre cancerosas expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3, con la condición de que el cáncer no sea leucemia mieloide. En otra realización, el método para prevenir una recidiva de la leucemia mieloide en un humano tratado previamente para la leucemia mieloide, que comprende administrar a un

humano con necesidad de dicha prevención, que había sido tratado previamente para la leucemia mieloide, una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recidiva de la leucemia mieloide y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado se administra en una dosis de más de 4 µg/kg al día.

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

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

En determinadas realizaciones de la presente invención, se puede utilizar secuencialmente quimioterapia convencional y los métodos descritos. En un aspecto específico de esta realización, primero se reducen los blastos de leucemia del paciente mediante la utilización de quimioterapia convencional, seguida de una pauta que comprende la administración de una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para estabilizar, reducir o erradicar significativamente. células madre cancerosas que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3.

3.1 Definiciones

Como se emplea en la presente memoria, el término “agente” se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia para utilización en la prevención, tratamiento, control y/o diagnóstico del cáncer, lo que incluye el conjugado de toxina diftérica-interleucina-3 de la presente invención.

Como se emplea en la presente memoria, el término “conjugado de la presente invención” se refiere a interleucina-3 o una porción, análogo o derivado de la misma que se une al receptor de interleucina-3 o a una subunidad del mismo, conjugada a toxina diftérica, una porción de la misma o un análogo de la misma. A menos que se indique de otro modo, los términos “compuesto de la presente invención” y “composición de la presente invención” se utilizan como alternativas al término “conjugado de la presente invención”.

Como se emplea en la presente memoria, el término “cantidad”, como se utiliza en el contexto de la cantidad de una población de células o células particulares, se refiere a la frecuencia, cantidad, porcentaje, cantidad relativa, o número de la célula o población o células particular.

Como se emplean en la presente memoria, los términos “aproximadamente” o “de forma aproximada”, a menos que se indique de otro modo, se refieren a un valor que no está más de 10 % por encima o por debajo del valor que está siendo modificado por el término.

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

Como se emplea en la presente memoria, el término “pequeña reducción”, en el contexto de una población de células particular (por ejemplo, células endoteliales circulantes y/o progenitores endoteliales circulantes) se refiere a una reducción de menos de 30 % en la población de células (por ejemplo, la población de células endoteliales circulantes y/o la población de progenitores endoteliales circulantes).

Como se emplea en la presente memoria, la expresión “agente de diagnóstico” se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se utiliza con la finalidad de diagnosticar cáncer. Los ejemplos no limitantes de agentes de diagnóstico incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, u otras proteínas, que incluyen las conjugadas a un agente detectable. Como se emplea en la presente memoria, el término “agentes detectables” se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que es detectable mediante cualquier metodología disponible a un experto en la materia. Los ejemplos no limitantes de agentes detectables incluyen colorantes, gases, metales, o radioisótopos. Como se emplea en la presente memoria, agente de diagnóstico y “agente de adquisición de imágenes” son términos equivalentes.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión “agente profiláctico” se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se utiliza con la finalidad de prevenir el cáncer. Los ejemplos de agentes profilácticos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, inmunoglobulinas (por ejemplo, Ig multiespecíficas, Ig de cadena sencilla, fragmentos de Ig, anticuerpos policlonales y sus fragmentos, anticuerpos monoclonales y sus fragmentos), proteínas de unión, agentes quimioespecíficos, agentes quimiotóxicos (por ejemplo, agentes contra el cáncer), terapia basada en la proliferación, y fármacos de molécula pequeña.

Como se emplea en la presente memoria, el término “agente terapéutico” se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se utiliza con la finalidad de tratar y/o controlar una enfermedad o trastorno. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, inmunoglobulinas (por ejemplo, Ig multiespecíficas, Ig de cadena sencilla, fragmentos de Ig, anticuerpos policlonales y sus fragmentos, anticuerpos monoclonales y sus fragmentos), péptidos (por ejemplo, receptores peptídicos, selectinas), proteínas de unión, productos biológicos, agentes quimioespecíficos, agentes quimiotóxicos (por ejemplo, agentes contra el cáncer), terapia basada en la proliferación, radiación, quimioterapia, agentes antiangiogénicos, y fármacos de molécula pequeña.

Como se emplea en la presente memoria, el término “terapia basada en la proliferación” se refiere a cualquier molécula, compuesto, sustancia y/o método que altera, inhibe o mata diferencialmente poblaciones de células que proliferan rápidamente (por ejemplo, células cancerosas), en comparación con poblaciones de células que se dividen más lentamente. Las terapias basadas en la proliferación pueden incluir, pero no se limitan a, las terapias quimioterapéuticas y radioterapias que se utilizan habitualmente en oncología. Un agente basado en la proliferación puede alterar, inhibir o matar diferencialmente células que proliferan rápidamente mediante cualquier mecanismo conocido para un experto en la materia, lo que incluye, pero no se limita a, alterando la función del ADN (lo que incluye la replicación del ADN), interfiriendo con enzimas implicadas en la reparación de ADN, intercalando ADN, interfiriendo con la transcripción o traducción de ARN, interfiriendo con enzimas implicadas en la replicación de ADN, interfiriendo con una topoisomerasa, tal como topoisomerasa II, interfiriendo con la mitosis, e inhibiendo enzimas necesarias para la síntesis de proteínas necesarias para la replicación celular. Los ejemplos específicos de terapias basadas en la proliferación incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos, procarbazona, hidroxiurea, agentes a base de platino, antraciclinas, inhibidores de la topoisomerasa II, venenos del huso, e inhibidores mitóticos.

Como se emplea en la presente memoria, el término “cáncer” se refiere a una neoplasia o tumor como resultado del crecimiento incontrolado anómalo de células. Los ejemplos no limitantes incluyen los cánceres descritos en la Sección 5.3.2. El término “cáncer” abarca una enfermedad que implica células cancerosas tanto premalignas como malignas. En algunas realizaciones, cáncer se refiere a un crecimiento excesivo localizado de células que no se ha diseminado a otras partes de un sujeto, es decir, un tumor localizado o, en ocasiones, benigno. En otras realizaciones, cáncer se refiere a un tumor maligno, que ha invadido y destruido estructuras corporales adyacentes y se ha diseminado a sitios distantes. En todavía otras realizaciones, el cáncer está asociado a un antígeno específico del cáncer.

Como emplea en la presente memoria, el término “células cancerosas” se refiere a células que adquieren un conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, que incluyen la capacidad de evadir la apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a señales anticrecimiento, invasión/metástasis tisular, potencial de crecimiento significativo y/o angiogénesis sostenida. El término “célula cancerosa” está destinado a abarcar células cancerosas tanto premalignas como malignas.

Como se emplea en la presente memoria, el término “célula o células madre cancerosas” se refiere a una célula que puede ser un progenitor de una célula cancerosa muy proliferativa. Una célula madre cancerosa tiene la capacidad de

volver a hacer crecer un tumor, como demuestra su capacidad para formar tumores en ratones inmunocomprometidos, y habitualmente de formar tumores tras el trasplante en serie posterior en ratones inmunocomprometidos. Las células madre cancerosas también son habitualmente de crecimiento lento con respecto a la masa de un tumor; es decir, las células madre cancerosas están generalmente latentes. En determinadas realizaciones, pero no en todas, la célula madre cancerosa puede representar aproximadamente 0,1 a 10 % de un tumor.

Como se emplea en la presente memoria, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para dar como resultado la prevención del desarrollo, recurrencia, o aparición de cáncer y uno o más síntomas del mismo, para potenciar o mejorar el efecto o efectos profilácticos de otra terapia, reducir la gravedad, la duración del cáncer, mitigar uno o más síntomas del cáncer, prevenir el avance del cáncer, causar la regresión del cáncer y/o potenciar o mejorar el efecto o efectos terapéuticos de otra terapia. En una realización, la cantidad de una terapia es eficaz para lograr uno, dos, tres o más resultados después de la administración de una, dos, tres o más terapias: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas; (2) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (3) una estabilización o reducción del crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) una alteración en la formación de un tumor; (5) la erradicación, eliminación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la duración o tasa de supervivencia sin enfermedad, sin recidiva, sin progresión, y/o global; (8) un aumento de la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución de la tasa de hospitalización, (10) una disminución de los periodos de hospitalización; (11) que el tamaño del tumor se mantenga y no aumente, o aumente en menos de 10 %, preferiblemente menos de 5 %, preferiblemente menos de 4 %, preferiblemente menos de 2 %; (12) un aumento del número de pacientes en remisión; (13) un aumento del periodo o duración de la remisión; (14) una disminución de la tasa de recurrencia del cáncer; (15) un aumento del tiempo hasta la recurrencia del cáncer; y (16) una mitigación de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión “humano de edad avanzada” se refiere a un humano de 65 años de edad o más, preferiblemente 70 años de edad o más.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión “adulto humano” se refiere a un humano de 18 años de edad o más.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión “niño humano” se refiere a un humano entre 24 meses de edad y 18 años de edad.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión “lactante humano” se refiere a un humano menor de 24 meses de edad, preferiblemente menor de 12 meses de edad, menor de 6 meses de edad, menor de 3 meses de edad, menor de 2 meses de edad, o menor de 1 mes de edad.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión “paciente humano” se refiere a cualquier humano, ya sea de edad avanzada, un adulto, un niño o un lactante.

Como se emplea en la presente memoria, el término “resistente” se determina con suma frecuencia por el fracaso a la hora de alcanzar un criterio de valoración clínico, por ejemplo, respuesta, duración prolongada de la respuesta, supervivencia sin enfermedad prolongada, supervivencia sin recidiva, supervivencia sin progresión y supervivencia global. Otra forma de definir ser resistente a una terapia es que un paciente no haya logrado una respuesta a una terapia, de modo tal que se determina que la terapia no es terapéuticamente eficaz.

Como se emplea en la presente memoria, el término “se une específicamente a un antígeno” y términos análogos se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno o un fragmento y no se unen específicamente a otros antígenos. Un péptido, polipéptido, proteína o anticuerpo que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos, polipéptidos o proteínas con menor afinidad, como se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un antígeno pueden tener reactividad cruzada con antígenos relacionados. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un antígeno no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos. Un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando se une al antígeno con mayor afinidad que a cualquier antígeno con reactividad cruzada, como se determina utilizando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Véase, por ejemplo, Paul, ed. , 1989, Fundamental Immunology, 2.^a edición, Raven Press, Nueva York, en las páginas 332-336 para consultar una exposición sobre la especificidad de los anticuerpos.

Como se emplea en la presente memoria, el término “en combinación”, en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere a la utilización de más de una terapia (por ejemplo, profiláctica y/o terapéutica). La utilización del término “en combinación” no limita el orden en el que se administran las terapias (por ejemplo, una primera y segunda terapia) a un sujeto. Una terapia se puede administrar antes de (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas,

96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), simultáneamente a, o posteriormente a (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración de una segunda terapia a un sujeto que tenía, tiene, o es propenso a tener cáncer. Las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de modo tal que las terapias puedan actuar juntas. En una realización particular, las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de modo tal que proporcionen un beneficio mayor que si se administraran de otro modo. Se puede administrar cualquier terapia adicional, en cualquier orden, con la otra terapia adicional.

Como se emplean en la presente memoria, los términos “controlar”, “que controla” y “control”, en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto, se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) o una combinación de terapias, aunque no dé como resultado una cura del cáncer. En determinadas realizaciones, se administra a un sujeto una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) para “controlar” el cáncer a fin de prevenir la progresión o empeoramiento de la afección.

Como se emplea en la presente memoria, el término “marcador”, en el contexto de una célula o tejido (por ejemplo, una célula o tumor normal o canceroso) significa cualquier antígeno, molécula u otra entidad química o biológica que se encuentra específicamente en un tejido que se desea identificar o sobre el mismo, o se identifica en un tejido particular afectado por una enfermedad o trastorno, o sobre el mismo. En realizaciones específicas, el marcador es un antígeno de superficie de las células que es expresado diferencial o preferentemente por tipos de células específicos. Por ejemplo, una célula madre cancerosa de leucemia expresa diferencialmente CD123 con respecto a una célula madre hematopoyética normal.

Como se emplea en la presente memoria, el término “fenotipo de marcador”, en el contexto de un tejido (por ejemplo, una célula normal o cancerosa, o una célula tumoral), significa cualquier combinación de antígenos (por ejemplo, receptores, ligandos y otros marcadores de superficie de las células), moléculas, u otras entidades químicas o biológicas que se encuentran específicamente en un tejido que se desea identificar o sobre el mismo, o en un tejido particular afectado por una enfermedad o trastorno. En realizaciones específicas, el fenotipo de marcador es un fenotipo de superficie de las células. De conformidad con esta realización, el fenotipo de superficie de las células se puede determinar detectando la expresión de una combinación de antígenos de superficie de las células. Los ejemplos no limitantes de fenotipos de superficie de células madre cancerosas de determinados tipos de tumores incluyen CD34⁺/CD38⁻, CD123⁺, CD44⁺/CD24⁻, CD133⁺, CD34⁺/CD10⁻/CD19⁻, CD138⁻/CD34⁻/CD19⁺, CD133⁺/RC2⁺, CD44⁺/α2β1^{hi}/CD133⁺, CLL-1, SLAM, y otros fenotipos de superficie de células madre cancerosas mencionados en la presente memoria, así como los que se conocen en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, el término “farmacéuticamente aceptable” significa autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos, la Farmacopea Europea, u otra farmacopea generalmente reconocida para utilización en animales y, más particularmente, en humanos.

Como se emplean en la presente memoria, los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención”, en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto, se refieren a la prevención o inhibición de la recurrencia, aparición y/o desarrollo de un cáncer o un síntoma del mismo en un sujeto como resultado de la administración de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) o una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos). En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a uno, dos, tres o más resultados después de la administración de una o más terapias: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas; (2) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (3) un aumento de la tasa de respuesta; (4) un aumento del periodo o duración de la remisión; (5) una disminución de la tasa de recurrencia del cáncer; (6) un aumento del tiempo hasta la recurrencia del cáncer; (7) un aumento de la supervivencia sin enfermedad, sin recidiva, sin progresión y/o global del paciente; y (8) una mitigación de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida. En realizaciones específicas, dichos términos se refieren a una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas.

Como se emplean en la presente memoria, los términos “fragmento” y “porción”, en el contexto de agentes proteínicos, se refieren a una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de aminoácido contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de una proteína o polipéptido.

Como se emplea en la presente memoria, el término “intervalo de referencia predeterminado” se refiere a un intervalo de referencia para la entidad biológica particular, por ejemplo, célula madre cancerosa, para un sujeto o una población de sujetos. Cada laboratorio puede establecer su propio intervalo de referencia para cada ensayo en particular, o se puede facilitar un intervalo de referencia estándar para cada ensayo y utilizarse a nivel local, regional, nacional o mundial, o puede ser específico del paciente. En una realización específica, el término se refiere a un intervalo de referencia para la cantidad de células madre cancerosas en un paciente (por ejemplo, como se determina mediante adquisición de imágenes *in vivo*) o un espécimen de un paciente. En otra realización específica, el término se refiere a un intervalo de referencia para la cantidad de células cancerosas en un paciente (por ejemplo, como se determina mediante adquisición de imágenes *in vivo*) o un espécimen de un paciente.

Como se emplea en la presente memoria, el término “pauta profilácticamente eficaz” se refiere a una pauta eficaz para la dosificación, cronología, frecuencia y duración de la administración de una o más terapias para la prevención del cáncer o un síntoma del mismo. En una realización específica, dichos términos se refieren la pauta logra uno, dos, tres o más de los resultados siguientes: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas; (2) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (3) un aumento de la tasa de respuesta; (4) un aumento del periodo o duración de la remisión; (5) una disminución de la tasa de recurrencia del cáncer; (6) un aumento del tiempo hasta la recurrencia del cáncer; (7) un aumento de la supervivencia sin enfermedad, sin recidiva, sin progresión, y/o global del paciente; y (8) una mitigación de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida.

Como se emplea en la presente memoria, el término “que estabiliza” y términos análogos, cuando se utilizan en el contexto de una población de células madre cancerosas o población de células cancerosas, se refieren a la prevención de un aumento de la población de células madre cancerosas o población de células cancerosas, respectivamente. En otras palabras, la cantidad de células madre cancerosas o la cantidad de células cancerosas que componen un cáncer se mantiene y no aumenta, o aumenta en menos de 10 %, preferiblemente menos de 5 %.

Como se emplea en la presente memoria, el término “pauta terapéuticamente eficaz” se refiere a una pauta para la dosificación, cronología, frecuencia y duración de la administración de una o más terapias para el tratamiento y/o control del cáncer o un síntoma del mismo. En una realización específica, la pauta logra uno, dos, tres o más de los resultados siguientes: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas; (2) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (3) una estabilización o reducción del crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) una alteración en la formación de un tumor; (5) la erradicación, eliminación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la duración o tasa de supervivencia sin enfermedad, sin recidiva, sin progresión, y/o global; (8) un aumento de la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución de la tasa de hospitalización; (10) una disminución de los periodos de hospitalización; (11) que el tamaño del tumor se mantenga y no aumente, o aumente en menos de 10 %, preferiblemente menos de 5 %, preferiblemente menos de 4 %, preferiblemente menos de 2 %; y (12) un aumento del número de pacientes en remisión.

Como se emplean en la presente memoria, los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan indistintamente. Como se emplea en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono y humano) y, de la forma más preferible, un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal no humano, tal como un animal de granja (por ejemplo, un caballo, vaca, cerdo u oveja) o un animal de compañía (por ejemplo, un perro o gato). En una realización específica, el sujeto es un humano de edad avanzada. En otra realización, el sujeto es un adulto humano. En otra realización, el sujeto es un niño humano. En otra realización, el sujeto es un lactante humano.

Como se emplean en la presente memoria, los términos “terapias” y “terapia” se pueden referir a cualquier método o métodos, composición o composiciones, y/o agente o agentes que se puede utilizar en la prevención, tratamiento y/o control de un cáncer o uno o más síntomas del mismo. En determinadas realizaciones, los términos “terapia” y “terapias” se refieren a quimioterapia, terapia con moléculas pequeñas, radioinmunoterapia, terapia con toxinas, terapia con enzimas activadoras de profármacos, terapia biológica, terapia con anticuerpos, terapia quirúrgica, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia antiangiogénica, terapia dirigida, terapia epigenética, terapia de desmetilación, terapia con inhibidores de histona desacetilasas, terapia de diferenciación, radioterapia, o una combinación de las anteriores y/u otras terapias útiles en la prevención, control y/o tratamiento de un cáncer o uno o más síntomas del mismo.

Como se emplean en la presente memoria, los términos “tratar”, “tratamiento” y “que trata”, en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto, se refieren a la reducción o inhibición de la progresión y/o duración del cáncer, la reducción o mitigación de la gravedad del cáncer, y/o la mitigación de uno o más síntomas del mismo como resultado de la administración de una o más terapias. En realizaciones específicas, dichos términos se refieren a uno, dos, tres o más resultados después de la administración de una, dos, tres o más terapias: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas; (2) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (3) una estabilización o reducción del crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) una alteración en la formación de un tumor; (5) la erradicación, eliminación o control del cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la duración o tasa de supervivencia sin enfermedad,

sin recidiva, sin progresión, y/o global; (8) un aumento de la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución de la tasa de hospitalización; (10) una disminución de los periodos de hospitalización; (11) que el tamaño del tumor se mantenga y no aumente, o aumente en menos de 10 %, preferiblemente menos de 5 %, preferiblemente menos de 4 %, preferiblemente menos de 2 %; y (12) un aumento del número de pacientes en remisión. En determinadas realizaciones, dichos términos se refieren a una estabilización o reducción de la población de células madre cancerosas. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a una estabilización o reducción del crecimiento de células cancerosas. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a una estabilización o reducción de la población de células cancerosas. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a una estabilización o reducción del crecimiento y/o formación de un tumor. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a la erradicación, eliminación o control del cáncer primario, regional o metastásico (por ejemplo, la minimización o retardo de la diseminación del cáncer). En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a una reducción de la mortalidad y/o un aumento de la tasa de supervivencia de una población de pacientes. En realizaciones adicionales, dichos términos se refieren a un aumento de la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o el número de pacientes que responden o están en remisión. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a una disminución de la tasa de hospitalización de una población de pacientes y/o una disminución del periodo de hospitalización para una población de pacientes.

Las concentraciones, cantidades, recuentos de células, porcentajes y otros valores numéricos se pueden presentar en la presente memoria en un formato de intervalos. Debe entenderse que dicho formato de intervalos se utiliza meramente por conveniencia y brevedad, y debe interpretarse de manera flexible para incluir, no sólo los valores numéricos citados explícitamente como límites del intervalo, sino también todos los valores numéricos individuales o subintervalos abarcados dentro de ese intervalo, como si cada valor numérico y subintervalo se citara explícitamente.

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1. Un modelo de la estructura tridimensional de la toxina diftérica (DT) basado en las coordenadas cristalográficas de rayos X. La cadena principal de carbono alfa se muestra con flechas planas para las láminas beta y con cilindros para las hélices alfa. Se muestran los dominios catalítico, de translocación y de unión a receptor.

Figura 2. Mecanismo de intoxicación celular por DT. Las etapas incluyen (a) unión celular, (b) endocitosis mediada por receptor, (c) translocación mediada por pH bajo, furina y tioredoxina reductasa, beta-COP y Hsp90, (d) replegamiento y ADP ribosilación de EF2, y (e) muerte celular. (Ratts *et al.*, "A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:15635-15640 (2005).

Figura 3. Un modelo de DT₃₈₈IL-3. La cadena principal de carbono alfa se muestra en azul para el dominio catalítico de DT, en verde para el dominio de translocación de DT, y en blanco para IL-3. Modelo basado en las coordenadas de rayos X para DT e IL-3 humana. (Choe *et al.*, "The crystal structure of diphtheria toxin", *Nature* 357:216-222 (1992).

Figura 4. Una microfotografía de una biopsia de médula ósea de un paciente, antes del tratamiento (A) y dos meses después del tratamiento (B) Tinción de Wright-Giemsa a un aumento de 400x.

Figura 5. Gráfica que muestra el porcentaje de pacientes con toxicidades relacionadas con el fármaco de grado 2 o inferior para DT₃₈₈IL-3 en relación con el Ejemplo 2, abajo.

Figura 6A-B. Gráfica que muestra los niveles séricos de DT₃₈₈IL-3 en el Día 1 (A) y el Día 12 (B) en relación con el Ejemplo 2, abajo.

Figuras 7A-C. Farmacocinética y respuesta inmunitaria en relación con el Ejemplo 2, abajo. **Figura 7A:** Cmáx (µg/ml) en función de la dosis (µg/kg). **Figura 7B:** Cmáx en el Día 12 frente a Cmáx en el Día 1, que muestra la relación entre Cmáx en la primera y la última dosis. **Figura 7C:** DT₃₈₈IL-3 sérico máximo (µg/ml) frente a anticuerpo antitoxina diftérica (anti-DT) sérico pretratamiento (µg/ml), que muestra la relación entre los niveles máximos de fármaco y los de anticuerpo pretratamiento.

Figura 8A: una microfotografía de aspirado de médula del paciente n.º 19 antes y después en relación con el Ejemplo 2, abajo. **Figura 8B:** recuentos sanguíneos para el paciente n.º 19 en relación con el Ejemplo 2, abajo. **Figura 8C:** una microfotografía de aspirado de médula del paciente n.º 36 antes y después en relación con el Ejemplo 2, abajo. **Figura 8D:** recuentos sanguíneos para el paciente n.º 36 en relación con el Ejemplo 2, abajo.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer composiciones farmacéuticas para utilización según las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere a un método para inhibir células que expresan receptor de interleucina-3, que comprende administrar a un humano con necesidad de dicha inhibición una composición farmacéutica que comprende

una cantidad de un conjugado de interleucina-3 humana-toxina diftérica eficaz para inhibir dichas células y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células expresan la subunidad alfa (en realizaciones específicas, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3. Otros métodos incluyen tratar, prevenir y/o controlar una enfermedad o trastorno que presenta, o está caracterizada por, células que expresan receptor de interleucina-3 administrando a un humano con necesidad de dicho tratamiento, prevención y/o control una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3 humana-toxina diftérica eficaz para inhibir dichas células y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células expresan la subunidad alfa (en realizaciones específicas, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria y enfermedad alérgica. Se describen métodos para purgar médula ósea o sangre periférica poniendo en contacto *ex vivo* la muestra de médula ósea o sangre periférica obtenida de un humano con una composición que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para purgar significativamente la médula ósea o sangre periférica de células que expresan la subunidad alfa (en realizaciones específicas, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3. Por consiguiente, también se describe un método para realizar un trasplante autólogo de médula ósea administrando de vuelta al paciente dicha médula ósea o sangre periférica purgada, así como composiciones que comprenden dicha médula ósea o sangre periférica purgada, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable (no forma parte de la presente invención).

5.1 Conjugado de interleucina-3-toxina diftérica

En una realización, un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica comprende la proteína interleucina-3 (IL-3) madura (que carece del péptido señal) de longitud completa, o una porción, análogo o derivado de la misma que se une al receptor de interleucina-3 o una subunidad del mismo expresada sobre una superficie de las células, conjugada mediante una tecnología recombinante o mediante enlace químico (covalente) a toxina diftérica, o una porción, análogo o derivado de la misma, la cual carece preferiblemente del dominio de unión celular natural. En una realización preferida, IL-3 es IL-3 humana. En determinadas realizaciones, el conjugado comprende los dominios catalítico y de translocación de toxina diftérica fusionados mediante un enlace covalente a IL-3 humana. En otras realizaciones, la toxina diftérica está enlazada mediante un enlazador peptídico a la porción de IL-3 humana del conjugado. El enlazador para el conjugado puede ser de dos, tres, cinco, diez o quince aminoácidos de longitud. La longitud del enlazador puede variar para proporcionar unión óptima del conjugado. En un aspecto preferido, el enlazador peptídico es de dos a cuatro aminoácidos de longitud. En un aspecto más específico, el enlazador peptídico es un enlazador de Met-His. Sin pretender ceñirnos a un mecanismo de acción particular, el enlazador peptídico flexible facilita el apareamiento de cadenas y minimiza el posible plegamiento. Las moléculas de enlazador se conocen habitualmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, Clin. Res. Cancer. 4:2483-90; Peterson *et al.*, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman *et al.*, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El conjugado puede comprender cualquier dominio de DT enlazado mediante cualquier molécula de enlazador conocida en la técnica a cualquier dominio de IL-3. En una realización específica, el conjugado es DT₃₈₈IL-3 (Figura 3), que es una proteína de fusión que comprende los aminoácidos 1-388 fusionados a IL-3 humana madura de longitud completa mediante un enlazador aminoacídico de Met-His.

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

En la presente invención, pueden ser útiles fragmentos, análogos y derivados de IL-3, siempre que, cuando se fusionan a la porción de toxina diftérica del conjugado, dichos fragmentos, análogos y derivados mantengan la capacidad de unir una subunidad del receptor de IL-3 o el receptor de IL-3 natural expresado sobre la superficie de una célula. Preferiblemente, la cinética de unión de los fragmentos, análogos o derivados sigue siendo la misma o solo varía en, como máximo, 25 %. El polipéptido de IL-3 puede ser de cualquier especie. Las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de los polipéptidos de IL-3 se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas, o las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos se pueden determinar utilizando técnicas de clonación y secuenciación conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, la IL-3 es una IL-3 de mamífero. En una realización preferida, un polipéptido de IL-3 es IL-3 humana, un análogo, derivado, o un fragmento de la misma. La secuencia de aminoácidos de IL-3 humana se puede encontrar en la base de datos GenBank (véase, por ejemplo, el n.º de entrada AAC08706).

Se describe un polipéptido de IL-3 que comprende una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácidos conservadora, pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos conservadoras, incluso más preferiblemente, no más de 40 sustituciones de aminoácidos conservadoras, todavía más preferiblemente, no más de 30 sustituciones de aminoácidos conservadoras, y todavía más preferiblemente, no más de 20 sustituciones de aminoácidos conservadoras, con respecto a la secuencia de aminoácidos de IL-3 natural (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana natural), lo que da como resultado un cambio silencioso, es decir, ningún cambio en la actividad. También se describe un polipéptido de IL-3 que comprende una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácidos conservadora; pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos conservadoras, con respecto a la secuencia de aminoácidos de IL-3 natural (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana natural), lo que da como resultado un cambio silencioso. En todavía otra realización, un polipéptido de IL-3 comprende una secuencia de aminoácidos que contiene una o más sustituciones conservadoras, o una combinación de sustituciones de aminoácidos conservadoras y no conservadoras, con respecto a la secuencia de aminoácidos de IL-3 natural, lo que da como resultado un cambio silencioso.

Para mejorar o alterar las características de los polipéptidos de IL-3, se puede emplear ingeniería de proteínas. Se puede utilizar tecnología de ADN recombinante conocida para los expertos en la materia para crear proteínas mutantes o “muteínas” novedosas, que incluyen sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos únicas o múltiples, o proteínas de fusión. Dichos polipéptidos modificados pueden presentar, por ejemplo, actividad, potencia o afinidad potenciadas, y/o mayor estabilidad. Además, estos se pueden purificar con rendimientos superiores y presentar mejor solubilidad que el polipéptido natural correspondiente, por ejemplo, en determinadas condiciones de purificación y almacenamiento. Por ejemplo, para muchas proteínas, se sabe en la técnica que se pueden suprimir uno o más aminoácidos del extremo N o del extremo C sin pérdida sustancial de función biológica. Un conjugado ejemplar comprende una IL-3 modificada con la sustitución de aminoácidos K116W en IL-3 humana. Otro conjugado ejemplar comprende IL-3 a la que le faltan los aminoácidos 125-133. Estos dos conjugados con secuencias de IL-3 mutantes presentan unión potenciada al receptor de IL-3 y presentan mayor citotoxicidad contra células de leucemia. (Para consultar ejemplos no limitantes de conjugados, véase Liu *et al.*, “Diphtheria toxin fused to variant interleukin-3 provides enhanced binding to the interleukin-3 receptor and more potent leukemia cell cytotoxicity”, *Exp. Hematol.* 32:277-281 (2004); Hogge *et al.*, “Variant diphtheria toxin-interleukin-3 fusion proteins with increased receptor affinity have enhanced cytotoxicity against acute myeloid leukemia progenitors”, *Clin. Cancer Res.* 12:1284-1291 (2006); Testa *et al.*, “Diphtheria toxin fused to variant human interleukin-3 induces cytotoxicity of blasts from patients with acute myeloid leukemia according to the level of interleukin-3 receptor expression”, *Blood* 106:2527-2529 (2005); y Klein *et al.*, “Receptor binding kinetics of human IL-3 variants with altered proliferative activity”, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288:1244-1249 (2001)).

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

5.1.1 Métodos para producir conjugados de interleucina-3-toxina diftérica

Los conjugados se pueden fabricar mediante técnicas de ADN recombinante estándar o mediante técnicas de síntesis de proteínas, por ejemplo, mediante la utilización de un sintetizador de péptidos. Por ejemplo, se puede sintetizar una molécula de ácido nucleico que codifica un conjugado de la presente invención mediante técnicas convencionales, que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, se puede llevar a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que, posteriormente, se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds. John Wiley & Sons, 1992).

Las secuencias de nucleótidos que codifican un conjugado (secuencias de IL-3 y toxina diftérica) se pueden obtener a partir de cualquier información disponible a los expertos en la materia (es decir, a partir de Genbank, la bibliografía, o mediante clonación rutinaria). La secuencia de nucleótidos codificadora de un conjugado se puede insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteínas insertada. En algunos casos, se puede truncar la secuencia de toxina diftérica con el fin de eliminar un dominio específico, tal como el dominio de direccionamiento. Las técnicas para modificar o truncar ADN son bien conocidas para los expertos en la materia de la biología molecular. Asimismo, se pueden ligar las secuencias de IL-3 y toxina diftérica de modo tal que se genere una secuencia de ADN que, cuando se traduce, crea un polipéptido que es un compuesto. En ejemplos preferidos, se introduce una secuencia de enlazador en la secuencia recombinante que enlaza la secuencia de IL-3 y la secuencia de toxina diftérica. En la presente invención se puede utilizar un abanico de sistemas de hospedador-vector para expresar la secuencia codificante de proteínas. Estos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo, virus de la vacuna de la viruela, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos, tales como levadura (por ejemplo *Pichia*), que contienen vectores de levadura; o bacterias (tales como *E. coli*) transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN de plásmidos, o ADN de cósmidos. Los elementos de expresión de vectores varían en cuanto a sus potencias y especificidades. En función del sistema de hospedador-vector utilizado, se puede utilizar uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción

adecuados. En una realización específica, la proteína es expresada en *E. coli*. En otra realización específica, la proteína es expresada en *Pichia*.

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

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

En células de hospedador de mamífero, se pueden utilizar varios sistemas de expresión a base de virus. En casos donde se utiliza un adenovirus como vector de expresión, se puede ligar la secuencia codificante del polipéptido o proteína de fusión a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico se puede insertar a continuación en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). También pueden ser necesarias señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de proteínas de fusión insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control traduccional y codones de iniciación exógenos pueden ser de un abanico de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc., apropiados (véase Bittner *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Los vectores de expresión que contienen insertos de un gen que codifica un conjugado se pueden identificar mediante tres estrategias generales: (a) hibridación de ácidos nucleicos, (b) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador", y (c) expresión de secuencias insertadas. En la primera estrategia, la presencia de un gen que codifica un conjugado en un vector de expresión se puede detectar mediante hibridación de ácidos nucleicos utilizando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen insertado que codifica el conjugado. En la segunda

estrategia, el sistema de vector/hospedador recombinante se puede identificar y seleccionar basándose en la presencia o ausencia de determinadas funciones de gen “marcador” (por ejemplo, actividad de timidina cinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.) causada por la inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica un conjugado en el vector. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos que codifica el conjugado se inserta dentro de la secuencia del gen marcador del vector, los recombinantes que contienen el gen que codifica el inserto de conjugado se pueden identificar por la ausencia de la función de gen marcador. En la tercera estrategia, los vectores de expresión recombinantes se pueden identificar ensayando el producto génico (por ejemplo, conjugado) expresado por el recombinante. Dichos ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales del conjugado en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, unión a un anticuerpo o al receptor de IL-3.

Además, se puede elegir una cepa de células de hospedador que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. La expresión de determinados promotores se puede elevar en presencia de determinados inductores; por tanto, la expresión de las proteínas de fusión o conjugados modificados genéticamente se puede controlar. Además, diferentes células de hospedador tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y modificación traduccional y postraduccional (por ejemplo, glicosilación, fosforilación de proteínas). Se pueden elegir líneas celulares o sistemas de hospedador apropiados para garantizar la modificación y procesamiento deseados de la proteína foránea expresada. Por ejemplo, la expresión en un sistema bacteriano producirá un producto no glicosilado y la expresión en levadura producirá un producto glicosilado. Se pueden utilizar células de hospedador eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento correcto de la transcripción, glicosilación y fosforilación primarias del producto génico. Dichas células de hospedador de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, NS0 y, en particular, líneas celulares neuronales tales como, por ejemplo, neuroblastomas humanos SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ (Sugimoto *et al.*, 1984, J. Natl. Cancer Inst. 73: 51-57), neuroblastoma humano SK-N-SH (Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704: 450-460), meduloblastoma cerebeloso humano Daoy (He *et al.*, 1992, Cancer Res. 52: 1144-1148), células de glioblastoma DBTRG-05MG (Kruse *et al.*, 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol. 28A: 609-614), neuroblastoma humano IMR-32 (Cancer Res., 1970, 30: 2110-2118), astrocitoma humano 1321N1 (Proc. Natl Acad. Sci. USA 1977, 74: 4816), astrocitoma humano MOG-G-CCM (Br. J. Cancer 1984, 49: 269), glioblastoma-astrocitoma humano U87MG (Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1968, 74: 465-486), glioblastoma humano A172 (Olopade *et al.*, 1992, Cancer Res. 52: 2523-2529), células de glioma de rata C6 (Benda *et al.*, 1968, Science 161: 370-371), neuroblastoma de ratón Neuro-2a (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1970, 65: 129-136), neuroblastoma de ratón NB41A3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1962, 48: 1184-1190), plexo coroideo de oveja SCP (Bolin *et al.*, 1994, J. Virol. Methods 48: 211-221), astrocito normal de gato G355-5, PG-4 (Haapala *et al.*, 1985, J. Virol. 53: 827-833), cerebro de hurón Mpf (Trowbridge *et al.*, 1982, In Vitro 18: 952-960), y líneas celulares normales, tales como, por ejemplo, corteza cerebral normal de rata CTX TNA2 (Radany *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6467-6471) tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst. Además, diferentes sistemas de expresión de vector/hospedador pueden efectuar reacciones de procesamiento hasta diferentes grados.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de conjugados recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresan de forma estable el conjugado. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, se pueden transformar células de hospedador con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador de selección. Después de la introducción del ADN foráneo, se puede dejar que las células diseñadas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y, a continuación, cambiarlas a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este método se puede utilizar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan un conjugado.

Se pueden utilizar varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, genes de timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler, *et al.*, 1977, Cell 11:223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy, *et al.*, 1980, Cell 22:817) que se pueden emplear en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Asimismo, se puede utilizar la resistencia a antimetabolitos como base de selección para dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler, *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O' Hare *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido 0-418 (Colberre-Garapin, *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre, *et al.*, 1984, Gene 30:147).

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

5.2 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un conjugado de toxina diftérica-interleucina-3. En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un conjugado y un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, una composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un conjugado y un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración veterinaria y/o humana. Las composiciones farmacéuticas también son adecuadas para purgado *ex vivo* de una muestra de médula ósea o sangre periférica, por ejemplo, como se puede realizar antes de la reintroducción de la muestra purgada de nuevo al paciente como un trasplante autólogo, como se puede realizar después de quimioterapia en dosis altas para el cáncer.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición sea administrada a un sujeto, siendo preferiblemente dicho sujeto un animal, lo que incluye, pero no se limita a, un humano, mamífero o animal humano, tal como una vaca, caballo, oveja, cerdo, ave, gato, perro, ratón, rata, conejo, cobaya, etc., y es más preferiblemente un mamífero, y de la forma más preferible un humano.

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

Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser atóxicos en las cantidades utilizadas. Resultará evidente a los expertos en la materia que la posología óptima del ingrediente o ingredientes activos en la composición farmacéutica dependerá de un abanico de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de sujeto (por ejemplo, humano), la salud general del sujeto, el tipo de cáncer para el que el sujeto necesita tratamiento, la utilización de la composición como parte de una pauta de múltiples fármacos, la forma particular del compuesto de la presente invención, la forma de administración, y la composición empleada.

El vehículo o medio farmacéuticamente aceptable puede estar particulado, de modo tal que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvos. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el vehículo o vehículos pueden ser gaseosos, a fin de proporcionar una composición de aerosol útil para, por ejemplo, administración inhalatoria.

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

La composición puede estar destinada a administración oral y, en ese caso, la composición está preferiblemente en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel están incluidas dentro de la formas consideradas en la presente memoria como sólidas o líquidas.

Como composición sólida para administración oral, la composición se puede formular en forma de polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, chicles, obleas, o similares. Dicha composición sólida contiene habitualmente uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes, tales como etilcelulosa, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes, tales como almidón, lactosa o dextrinas; agentes desintegrantes, tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primojel, almidón de maíz y similares; lubricantes, tales como estearato de magnesio o Sterotex; agentes deslizantes, tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante, tal como menta, salicilato de metilo o saborizante de naranja, y un agente colorante.

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

La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión, o suspensión. El líquido puede ser útil para administración oral o para suministro mediante inyección. Cuando está destinada a administración oral, una composición puede comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante, y potenciador del sabor. En una composición para administración mediante inyección, también se pueden incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante, y agente isotónico.

Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones, u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles, tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos, tales como mono- o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol, u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral puede estar contenida en una ampolla, una jeringa desechable, o un vial de dosis múltiples fabricado de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición inyectable es preferiblemente estéril.

Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de modo tal que se obtenga una posología adecuada (véase la Sección 5.3.1, abajo, para consultar las posologías adecuadas). Habitualmente, esta cantidad es al menos 0,01 % de un conjugado en peso de la composición. Cuando está destinada a administración oral, esta cantidad se puede variar para que esté entre 0,1 % y 80 % en peso de la composición. Las composiciones orales preferidas pueden comprender entre 4 % y 50 % del compuesto en peso de la composición. Las composiciones preferidas se preparan de modo tal que una unidad posológica parenteral contenga entre 0,01 % y 2 % en peso del compuesto.

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

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

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos de la presente divulgación localmente al área con necesidad de tratamiento. Esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito después de la cirugía; mediante inyección, por medio de un catéter; por medio de un supositorio; o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, lo que incluye membranas, tales como membranas Sialastic, o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o el sitio anterior) de un cáncer, tumor, o tejido precanceroso. En determinadas realizaciones, puede ser deseable introducir uno o más compuestos de la presente divulgación en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, lo que incluye inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, fijado a un reservorio, tal como un reservorio de Ommaya. En determinadas realizaciones, se pueden inyectar uno o más compuestos de la presente divulgación por vía intraperitoneal.

También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante utilización de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarburo o sintético. En determinadas realizaciones, los compuestos de la presente divulgación se pueden formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales, tales como triglicéridos.

En todavía otra realización, los compuestos de la presente divulgación se pueden suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba (véase Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald *et al.*, Surgery 1980, 88: 507; Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 1989, 321: 574). En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York, 1984; Ranger y Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 1983, 23, 61; véase también Levy *et al.*, Science 1985, 228, 190; During *et al.*, Ann. Neurol. 1989, 25, 351; Howard *et al.*, J. Neurosurg., 1989, 71, 105). En todavía otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana de los compuestos de la presente divulgación, por ejemplo, el cerebro, lo que requiere, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, arriba, volumen 2, páginas 115-138). También se pueden utilizar otros sistemas de liberación controlada expuestos en la revisión de Langer (Science 1990, 249, 1527-1533).

En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de los compuestos de la presente divulgación (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5,679,377; la patente de EE. UU. n.º 5,916,597; la patente de EE. UU. n.º 5,912,015; la patente de EE. UU. n.º 5,989,463; la patente de EE. UU. n.º 5,128,326; la publicación PCT n.º WO 99/15154; y la publicación PCT n.º WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está exento de impurezas lixiviables y es estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable.

En una realización específica, se puede utilizar una bomba para suministrar los compuestos de la presente divulgación (véase, por ejemplo, Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald *et al.*, Surgery 1980, 88: 507; Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 1989, 321: 574). En una realización específica, la bomba puede ser, pero no se limita a, una bomba similar a las de insulina.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, miniesferas, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, atomizadores, o cualquier forma adecuada para utilización. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una cápsula (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5,698,155). Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, de E.W. Martin.

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

En una realización preferida, los conjugados se formulan de conformidad con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a animales, particularmente seres humanos. Habitualmente, los vehículos o medios para administración intravenosa son soluciones acuosas de tampón isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran independientemente o mezclados en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento agua en un envase sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando se va a administrar un conjugado mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando el conjugado se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua para inyección estéril o solución salina de modo tal que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones para suministro oral pueden estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires. Las composiciones administradas por vía oral pueden comprender uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes saborizantes, tales como menta, aceite de gaulteria, o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para producir una composición farmacéuticamente aceptable. Asimismo, cuando están en forma de comprimidos o píldoras, las composiciones se pueden recubrir para retardar su desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando de ese modo una acción sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. Las membranas selectivamente permeables que rodean un complejo conductor osmóticamente activo también son adecuadas para composiciones administradas por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea la cápsula es absorbido por el complejo conductor, que se hincha para desplazar el agente o composición agente a través de una abertura. Estas plataformas de suministro pueden proporcionar un perfil de suministro de orden esencialmente cero, al contrario que los perfiles enriquecidos de las

formulaciones de liberación inmediata. También se puede utilizar un material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol. Las composiciones orales pueden incluir vehículos estándar, tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Dichos vehículos son preferiblemente de grado farmacéutico.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar destinadas a administración tópica, en cuyo caso, el vehículo puede estar en forma de una solución, emulsión, pomada, o en base gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abejas, aceite mineral, diluyentes, tales como agua y alcohol, y emulsionantes y estabilizantes. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición para administración tópica. Si está destinada a administración transdérmica, la composición puede estar en forma de un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un compuesto de la presente invención de entre 0,01 % y 10 % p/v (peso por volumen unitario de composición).

Las composiciones pueden incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad posológica sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una cubierta de recubrimiento alrededor de los ingredientes activos. Los materiales que forman la cubierta de recubrimiento son habitualmente inertes, y se pueden seleccionar de entre, por ejemplo, entre azúcar, goma laca, y otros agentes de recubrimiento entérico. Alternativamente, los ingredientes activos pueden estar encapsulados en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden consistir en unidades posológicas gaseosas, por ejemplo, pueden estar en forma de un aerosol. El término aerosol se utiliza para denotar un abanico de sistemas que varían desde los de naturaleza coloidal hasta sistemas que consisten en paquetes presurizados. El suministro puede ser mediante gas licuado o comprimido, o mediante un sistema de bombas adecuado que dispensa los ingredientes activos. Los aerosoles de las composiciones se pueden suministrar en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos con el fin de suministrar la composición. El suministro del aerosol incluye el envase, activadores, válvulas, subenvases, espaciadores y similares necesarios, que en conjunto pueden formar un kit. Los aerosoles preferidos pueden ser determinados por un experto en la materia, sin experimentación excesiva.

Ya sea en forma sólida, líquida o gaseosa, las composiciones pueden comprender un agente activo adicional seleccionado de entre los que incluyen, pero no se limitan a, un agente profiláctico adicional, un agente terapéutico adicional, un agente antiemético, un factor estimulante de colonias hematopoyéticas, una terapia adyuvante, una vacuna u otro agente inmunoestimulante, un agente a base de anticuerpos/fragmentos de anticuerpo, un antidepresivo y un agente analgésico. Por ejemplo, en una realización particular, la composición farmacéutica comprende un compuesto, un agente adicional, y un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar utilizando metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición destinada a ser administrada mediante inyección se puede preparar combinando un compuesto de la presente invención con agua a fin de formar una solución. Se puede añadir un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son complejos que pueden interactuar de forma no covalente con un compuesto de la presente invención a fin de facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto de la presente invención en el sistema de suministro acuoso.

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

5.3 Utilizaciones terapéuticas y profilácticas de conjugados de fusión de interleucina-3-toxina diftérica

Se describen métodos para inhibir células que expresan receptor de IL-3 en un humano con necesidad de lo mismo administrando una cantidad eficaz de un conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica. En determinadas realizaciones, las células que expresan receptor de IL-3 no son células de leucemia mieloide. En algunas realizaciones, las células expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3. En otras realizaciones, las células expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3. En todavía otras realizaciones, las células expresan las subunidades tanto alfa como beta del receptor de IL-3.

Se describen terapias que implican administrar uno o más conjugados de interleucina-3-toxina diftérica y composiciones que comprenden los conjugados de interleucina-3-toxina diftérica a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, para prevenir, tratar, controlar y/o mitigar una enfermedad o trastorno que presenta, o está caracterizada por, expresión de receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de la misma. En una realización, el método para prevenir, tratar, controlar y/o mitigar una enfermedad o trastorno que presenta, o está caracterizada por, expresión de receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de la misma, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de la misma una cantidad eficaz de uno o más conjugados de interleucina-3-toxina diftérica. Dichas enfermedades y trastornos incluyen cáncer, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias (que no forman parte de la presente invención).

También se describen métodos que comprenden administrar a un sujeto con necesidad de las mismas un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica y una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos)

- distintas del conjugado de interleucina-3-toxina diftérica que se estén utilizando actualmente, se hayan utilizado, se sepa que son útiles, o puedan ser útiles en la prevención, tratamiento, control y/o mitigación de una enfermedad o trastorno que presenta, o está caracterizada por, expresión de receptor de interleucina-3 o de uno o más síntomas de la misma. Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente. En una realización específica, las terapias combinadas comprenden una cantidad eficaz de un conjugado y una cantidad eficaz de al menos otra terapia que tiene el mismo mecanismo de acción que dicho conjugado. En una realización específica, las terapias combinadas comprenden una cantidad eficaz de un conjugado y una cantidad eficaz de al menos otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente a dicho conjugado. En determinadas realizaciones, las terapias combinadas mejoran el efecto profiláctico o terapéutico de un conjugado funcionando junto con el conjugado para tener un efecto aditivo o sinérgico. En determinadas realizaciones, las terapias combinadas reducen los efectos secundarios asociados a los agentes profilácticos o terapéuticos. En otras realizaciones, las terapias combinadas se administran antes de, durante, o después de la administración de las composiciones.
- El cáncer, o una enfermedad neoplásica, que incluye, pero no se limita a, neoplasias, tumores, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno caracterizada por crecimiento celular incontrolado, se puede tratar, eliminar, retardar, controlar, inhibir o prevenir administrando a un sujeto con necesidad de la misma una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un compuesto de la presente invención. Se describe el tratamiento, supresión, retardo, control, inhibición del crecimiento y/o progresión, y la prevención del cáncer o enfermedad neoplásica como se describe en la presente memoria.
- En un aspecto, los conjugados se administran como monoterapia para la prevención, tratamiento y/o control del cáncer.
- Se describe un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado o una composición farmacéutica, en donde el paciente ha sido diagnosticado de cáncer.
- Un aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado o una composición farmacéutica, en donde el paciente ha recidivado de cáncer.
- Un aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado o una composición farmacéutica, en donde la terapia del paciente ha fracasado o está fracasando.
- Se describe un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado o una composición farmacéutica, en donde el paciente está en remisión del cáncer.
- Un aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar al paciente una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado o una composición farmacéutica, en donde el paciente es resistente a la terapia.
- En un aspecto, el cáncer es un cáncer hematológico. Por ejemplo, el cáncer puede ser leucemia, linfoma, síndrome mielodisplásico (SMD), o mieloma. En otra realización, el cáncer es un tumor sólido.
- En una realización de este aspecto, el paciente ha recibido o está recibiendo otra terapia. En otra realización de este aspecto, el paciente no ha recibido previamente una terapia para la prevención, tratamiento y/o control del cáncer.
- El facultativo médico puede diagnosticar al paciente utilizando cualquiera de los métodos de cribado del cáncer convencionales que incluyen, pero no se limitan a, examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen rectal, examen de mama, examen de ganglios linfáticos, examen abdominal, vigilancia de la piel, exploración testicular, palpación general), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), citología vaginal (cáncer de cuello uterino), sangre oculta en heces, pruebas de sangre (por ejemplo, prueba de hemograma completo (CBC), prueba de antígeno prostático específico (PSA), prueba de antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba de antígeno del cáncer (CA)-125, alfafetoproteína (AFP), pruebas de función hepática), análisis de cariotipado, análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de malignidades hematológicas), histología, citología, citometría de flujo, análisis de esputo, y métodos de adquisición de imágenes (por ejemplo, tomografía computarizada (TC), adquisición de imágenes de resonancia magnética (IRM), ecografía, adquisición de imágenes de rayos X, mamografía, tomografías por emisión de positrones (TEP), gammagrafías óseas, gammagrafías con radionúclidos).

Se describe un método para prevenir, tratar y/o controlar un tumor sólido en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente con necesidad de la misma una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado o una composición farmacéutica, en donde el paciente ha sido diagnosticado de un tumor sólido, y en donde el paciente se ha sometido a una terapia primaria para reducir la masa del tumor. La terapia primaria para reducir el tamaño de la masa tumoral es preferiblemente una terapia distinta de un conjugado. En una realización específica de este aspecto, el tumor sólido es fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, citadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma, o retinoblastoma.

Se describe un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer, comprendiendo el método administrar a un paciente con necesidad de la misma una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado, en donde el paciente ha recibido otra terapia. En algunas realizaciones, la terapia previa es, por ejemplo, quimioterapia, terapia con moléculas pequeñas, radioinmunoterapia, terapia con toxinas, terapia con enzimas activadoras de profármacos, terapia biológica, terapia con anticuerpos, terapia quirúrgica, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia antiangiogénica, terapia dirigida, terapia epigenética, terapia de desmetilación, terapia con inhibidores de histona desacetilasas, terapia de diferenciación, radioterapia, o cualquier combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, la terapia previa ha fracasado en el paciente. En algunas realizaciones, la pauta terapéuticamente eficaz que comprende la administración de un conjugado se administra al paciente inmediatamente después de que el paciente se haya sometido a la terapia previa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el resultado de la terapia previa puede ser desconocido antes de administrar el conjugado al paciente.

Otro aspecto se refiere a un método para prevenir el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente con necesidad de la misma una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado, en donde el cáncer del paciente ha entrado en remisión. En algunas realizaciones de este aspecto, mediante la administración de una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, el facultativo médico puede curar eficazmente el cáncer o prevenir su reaparición.

Otro aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente con necesidad de la misma una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un compuesto o composición de la presente divulgación, en donde el conjugado se administra en una dosis que es inferior a la dosis máxima tolerada (DMT) durante un periodo de tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más.

Otro aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), comprendiendo el método administrar a un paciente con necesidad de la misma una pauta profilácticamente eficaz o una pauta terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente un conjugado de la presente divulgación, en donde el conjugado se administra en una dosis que es inferior a la dosis equivalente en humanos (DEH) del nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) durante un periodo de tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más. El NOAEL, como se determina en estudios en animales, es útil para determinar la dosis de partida máxima recomendada para ensayos clínicos en humanos. Por ejemplo, los NOAEL se pueden extrapolar para determinar dosis equivalentes en humanos. Habitualmente, dichas extrapolaciones entre especies se realizan basándose en las dosis que están normalizadas al área de superficie corporal (es decir, mg/m²). En realizaciones específicas, los NOAEL se determinan en ratones, hamsters, ratas, hurones, cobayas, conejos, perros, primates (monos, titíes, monos ardilla, babuínos), microcerdos, o minicerdos. Para consultar una exposición sobre el uso de NOAEL y su extrapolación para determinar dosis equivalentes en humanos, véase la Guía para la industria que estima la dosis de partida máxima segura en ensayos clínicos iniciales para tratamientos en voluntarios adultos sanos, Centro de Evaluación e Investigación de Fármacos (CDER) del Departamento de Salud y Servicios Humanos, Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos, Farmacología y Toxicología, Julio de 2005.

Sin ceñirse a ninguna teoría específica, los solicitantes creen que mediante la administración de las pautas profiláctica y/o terapéuticamente eficaces, la población de células madre cancerosas de un cáncer/tumor se estabiliza o reduce, a fin de limitar o prevenir la posible repoblación del tumor.

En determinadas realizaciones de estos aspectos, las pautas comprenden administrar una pauta profilácticamente eficaz y/o una pauta terapéuticamente eficaz, en donde la pauta da como resultado una reducción de la población de células madre cancerosas en el paciente. En una realización, se monitoriza al paciente que se está sometiendo a la pauta para determinar si la pauta ha dado como resultado una reducción de la población de células madre cancerosas en el paciente.

Habitualmente, la monitorización de la cantidad de células madre cancerosas se realiza detectando la cantidad de células madre cancerosas en un espécimen extraído del paciente. Los métodos para detectar la cantidad de células madre cancerosas en un espécimen se describen abajo, en la Sección 5.4. Esta etapa de monitorización se realiza habitualmente al menos 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, o 30, 60, 90, 120 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, o >12 meses después de que el paciente comience a recibir la pauta.

En algunas realizaciones, el espécimen puede ser un espécimen de sangre, en donde se cuantifica la cantidad de células madre cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo unitario en el caso de un análisis histológico). En determinadas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre, como un subconjunto de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre, o como un subconjunto de un subconjunto de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre. En otras realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas se puede determinar como un porcentaje de las células sanguíneas totales.

En otras realizaciones, el espécimen extraído del paciente es un espécimen de tejido (por ejemplo, una biopsia extraída de tejido presuntamente canceroso), donde la cantidad de células madre cancerosas se puede medir, por ejemplo, sobre la base de la cantidad de células madre cancerosas por peso unitario del tejido. En determinadas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en el tejido, como un subconjunto de las células cancerosas presentes en el tejido, o como un subconjunto de un subconjunto de las células cancerosas presentes en el tejido.

La cantidad de células madre cancerosas en el espécimen extraído se puede comparar con la cantidad de células madre cancerosas medida en especímenes de referencia para evaluar la eficacia de la pauta y la mitigación del cáncer en terapia. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que se está sometiendo a terapia, en donde el espécimen se extrae del paciente en un momento anterior (por ejemplo, antes de recibir la pauta, como muestra de referencia basal, o en un momento anterior mientras está recibiendo la terapia). En otra realización, la muestra de referencia se extrae de un paciente sano, no afectado de cáncer.

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

Si se determina que la reducción de la cantidad de células madre cancerosas es demasiado pequeña, tras comparar la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen extraído del paciente que se está sometiendo a la pauta con el espécimen de referencia, el facultativo médico tiene varias opciones para ajustar la pauta. Por ejemplo, el facultativo médico puede aumentar a continuación la posología del compuesto o composición administrado, la frecuencia de administración, la duración de la administración, o cualquier combinación de las mismas. En una realización específica, después de que se haya realizado la determinación, se puede administrar una segunda cantidad eficaz de un compuesto o composición al paciente.

En determinadas realizaciones, si se determina que la reducción de la cantidad de células madre cancerosas es aceptable, tras comparar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra obtenida del paciente que se está sometiendo a la pauta terapéutica o profiláctica con la muestra de referencia, el facultativo médico puede decidir no ajustar la pauta. Por ejemplo, el facultativo médico puede decidir no aumentar la posología del compuesto o composición que se está administrando, la frecuencia de administración, la duración de la administración, o cualquier combinación de las mismas. Además, el facultativo médico puede decidir añadir terapias adicionales o combinar terapias.

En determinadas realizaciones, las pautas comprenden administrar una pauta profilácticamente eficaz y/o una pauta terapéuticamente eficaz, en donde la pauta da como resultado una reducción de la cantidad de células cancerosas en el paciente. En una realización, se monitoriza al paciente que se está sometiendo a la pauta para determinar si la pauta ha dado como resultado una reducción de la cantidad de células cancerosas en el paciente.

Habitualmente, la monitorización de la cantidad de células cancerosas se realiza detectando la cantidad de células cancerosas en un espécimen extraído del paciente. Los métodos para detectar la cantidad de células cancerosas en un espécimen se describen abajo, en la Sección 5.5. Esta etapa de monitorización se realiza habitualmente al menos 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, o 30, 60, 90, 120 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, o >12 meses después de que el paciente comience a recibir la pauta.

En algunas realizaciones, el espécimen puede ser un espécimen de sangre, en donde se cuantifica la cantidad de células cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo unitario en el caso de un análisis histológico). En determinadas realizaciones, la población de células cancerosas se puede determinar como un porcentaje de las células sanguíneas totales.

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

En otras realizaciones, el espécimen extraído del paciente es un espécimen de tejido (por ejemplo, una biopsia extraída de tejido presuntamente canceroso), donde la cantidad de células cancerosas se puede medir, por ejemplo, sobre la base de la cantidad de células cancerosas por peso unitario del tejido. La cantidad de células cancerosas también se puede medir utilizando inmunohistoquímica o citometría de flujo.

La cantidad de células cancerosas en el espécimen extraído se puede comparar con la cantidad de células cancerosas medida en muestras de referencia para evaluar la eficacia de la pauta y la mitigación del cáncer en terapia. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que se está sometiendo a terapia, en donde el espécimen del paciente se extrae en un momento anterior (por ejemplo, antes de recibir la pauta, como muestra de referencia basal, o en un momento anterior mientras está recibiendo la terapia). En otra realización, la muestra de referencia se extrae de un paciente sano, no afectado de cáncer.

En otras realizaciones, la población de células cancerosas en el espécimen extraído se puede comparar con un intervalo de referencia predeterminado. En una realización específica, el intervalo de referencia predeterminado está basado en la cantidad de células cancerosas obtenidas de una población o poblaciones de pacientes que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente que se está sometiendo a la terapia.

Si la reducción de la población de células cancerosas se considera demasiado pequeña, tras comparar la cantidad de células cancerosas en el espécimen extraído de los pacientes que se están sometiendo a terapia con el espécimen de referencia, el facultativo médico tiene varias opciones para ajustar la pauta terapéutica. Por ejemplo, el facultativo médico puede aumentar a continuación la posología del compuesto o composición administrado, la frecuencia de administración, la duración de la administración, o cualquier combinación de las mismas. En una realización específica, después de que se haya realizado la determinación, se puede administrar una segunda cantidad eficaz de un compuesto o composición al paciente.

Si la reducción de la población de células cancerosas se considera que es adecuada, tras comparar la cantidad de células cancerosas en el espécimen extraído de los pacientes que se están sometiendo a terapia con el espécimen de referencia, el facultativo médico puede decidir no ajustar la pauta terapéutica. Por ejemplo, el facultativo médico puede decidir no aumentar la posología del compuesto o composición administrado, la frecuencia de administración, la duración de la administración, o cualquier combinación de las mismas.

Los métodos de monitorización anteriores también se pueden utilizar para monitorizar la cantidad de células que expresan receptor de interleucina-3 donde la enfermedad o trastorno no es un cáncer, es decir, en una enfermedad alérgica o una enfermedad autoinmunitaria (no forman parte de la presente invención).

En algunas realizaciones, el facultativo médico puede decidir medir la población cancerosa utilizando técnicas de adquisición de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, se puede conjugar un ligando para un marcador tumoral a un radioisótopo, un compuesto emisor de fotones, u otro compuesto emisor de señales, y a continuación se puede inyectar el ligando al paciente. Las células cancerosas se pueden cuantificar a continuación midiendo la señal generada cuando el ligando se une a las células cancerosas *in vivo*.

5.3.1 Posología y frecuencia de administración

La cantidad de una composición farmacéutica de toxina diftérica-interleucina-3 utilizada en las pautas profilácticas y/o terapéuticas que será eficaz en la prevención, tratamiento y/o control de enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, lo que incluye el cáncer, se puede determinar mediante métodos dados a conocer en la presente memoria. La frecuencia y posología variarán según factores específicos para cada paciente en función de los conjugados específicos administrados, la gravedad de la afección (por ejemplo, cancerosa), la vía de administración, así como la edad, peso corporal, respuesta y antecedentes médicos del paciente. Por ejemplo, la posología de un conjugado que será eficaz en el tratamiento, prevención y/o

control del cáncer se puede determinar administrando el compuesto en un modelo animal, tal como, por ejemplo, los modelos animales dados a conocer en la presente memoria o conocidos para los expertos en la materia. Véase la Sección 5.7.2, abajo. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos posológicos óptimos. Véase la Sección 5.7.1, abajo.

En algunas realizaciones, las pautas profilácticas y/o terapéuticas comprenden titular las posologías administradas al paciente a fin de lograr una medida de eficacia terapéutica especificada. Dichas medidas incluyen una reducción de la cantidad de células madre cancerosas del paciente o del mismo, y/o una reducción de la cantidad de células cancerosas en el paciente o del mismo.

En algunas realizaciones, las pautas profilácticas y/o terapéuticas comprenden administrar posologías y pautas de un conjugado o una composición farmacéutica que son eficaces para reducir las células madre cancerosas. Los métodos que se pueden utilizar para determinar la cantidad de células madre cancerosas en un paciente antes de, durante, y/o después de la terapia se exponen abajo, en la Sección 5.4.

En determinadas realizaciones, la posología del conjugado en la pauta profiláctica y/o terapéutica se ajusta a fin de lograr una reducción de la cantidad de células madre cancerosas encontradas en un espécimen de ensayo extraído de un paciente después de someterse a la pauta terapéutica, en comparación con una muestra de referencia. Aquí, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que se está sometiendo a terapia, en donde el espécimen se extrae del paciente en un momento anterior. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del mismo paciente, antes de recibir la pauta profiláctica o terapéutica. En realizaciones específicas, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen de prueba es al menos 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % menor que en la muestra de referencia.

En otras realizaciones, la posología del conjugado en la pauta profiláctica y/o terapéutica se ajusta a fin de lograr una reducción de la cantidad de células madre cancerosas encontradas en un espécimen de prueba extraído de un paciente después de someterse a la pauta profiláctica y/o terapéutica, en comparación con una muestra de referencia, en donde el espécimen de muestra de referencia se extrae de un paciente sano, no afectado de cáncer. En realizaciones específicas, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen de prueba está al menos dentro de 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, o 2 % de la cantidad de células cancerosas en la muestra de referencia.

En algunas realizaciones, la posología del conjugado en la pauta profiláctica y/o terapéutica se ajusta a fin de lograr una cantidad de células madre cancerosas que se encuentre dentro de un intervalo de referencia predeterminado. En estas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en un espécimen de ensayo se compara con un intervalo de referencia predeterminado. En una realización específica, el intervalo de referencia predeterminado está basado en la cantidad de células madre cancerosas obtenidas de una población o poblaciones de pacientes que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente que se está sometiendo a la terapia.

En algunas realizaciones, las pautas profilácticas y/o terapéuticas comprenden administrar posologías de un conjugado o una composición farmacéutica que son eficaces para reducir la población de células cancerosas. Los métodos que se pueden utilizar para determinar la población de células cancerosas en un paciente que se está sometiendo a tratamiento se exponen abajo, en la Sección 5.5.

En determinadas realizaciones, la posología del conjugado en la pauta profiláctica y/o terapéutica se ajusta a fin de lograr una reducción de la cantidad de células cancerosas encontradas en un espécimen de prueba extraído de un paciente que se está sometiendo a la pauta profiláctica y/o terapéutica, en comparación con una muestra de referencia. Aquí, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que se está sometiendo a terapia, en donde el espécimen se extrae del paciente en un momento anterior. En una realización, la muestra de referencia es un espécimen extraído del mismo paciente, antes de recibir la pauta profiláctica y/o terapéutica. En realizaciones específicas, la cantidad de células cancerosas en el espécimen de prueba es al menos 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o 60 % menor que en la muestra de referencia.

En algunas realizaciones, la posología del conjugado en la pauta profiláctica y/o terapéutica se ajusta a fin de lograr una cantidad de células cancerosas que se encuentre dentro de un intervalo de referencia predeterminado. En estas realizaciones, la cantidad de células cancerosas en un espécimen de prueba se compara con un intervalo de referencia predeterminado.

En otras realizaciones, la posología del conjugado en la pauta profiláctica y/o terapéutica se ajusta a fin de lograr una reducción de la cantidad de células cancerosas encontradas en un espécimen de prueba extraído de un paciente después de someterse a la pauta profiláctica y/o terapéutica, en comparación con una muestra de referencia, en donde la muestra de referencia es un espécimen extraído de un paciente sano, no afectado de cáncer. En realizaciones específicas, la cantidad de células cancerosas en el espécimen de prueba está al menos dentro de 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, o 2 % de la cantidad de células cancerosas en la muestra de referencia.

Al tratar a determinados pacientes humanos que tienen tumores sólidos, la extracción de múltiples especímenes de tejido de un presunto sitio tumoral puede resultar o no impracticable. En estas realizaciones, la posología de los compuestos en la pauta profiláctica y/o terapéutica para un paciente humano se extrapola a partir de dosis de modelos animales que son eficaces para reducir la cantidad de células madre cancerosas en esos modelos animales. En los modelos animales, las pautas profilácticas y/o terapéuticas se ajustan a fin de lograr una reducción de la cantidad de células madre cancerosas encontradas en un espécimen de prueba extraído de un animal después de someterse a la pauta profiláctica y/o terapéutica, en comparación con una muestra de referencia. La muestra de referencia puede ser un espécimen extraído del mismo animal, antes de recibir la pauta profiláctica y/o terapéutica. En realizaciones específicas, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen de prueba es al menos 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o 60 % menor que en la muestra de referencia. Las dosis eficaces para reducir la cantidad de células madre cancerosas en los animales se pueden normalizar a la superficie corporal (mg/m^2) para proporcionar una dosis humana equivalente.

Las pautas profilácticas y/o terapéuticas dadas a conocer en la presente memoria comprenden la administración de un conjugado o composiciones farmacéuticas al paciente en una única dosis o en múltiples dosis (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, o más dosis).

En una realización, las pautas profilácticas y/o terapéuticas comprenden la administración de un conjugado o composiciones farmacéuticas del mismo en múltiples dosis. Cuando se administran en múltiples dosis, el conjugado o las composiciones farmacéuticas se administran con una frecuencia y en una cantidad suficientes para prevenir, tratar y/o controlar la afección. En una realización, la frecuencia de administración varía de una vez al día a aproximadamente una vez cada ocho semanas. En otra realización, la frecuencia de administración varía de aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una vez cada seis semanas. En una realización, la frecuencia de administración varía de aproximadamente una vez cada tres semanas a aproximadamente una vez cada cuatro semanas. En determinadas realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de una semana a dos años. En todavía otra realización, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas o más. En otras realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a un año. En realizaciones adicionales, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a seis meses. En algunas realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a tres meses. En todavía otras realizaciones, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a seis semanas. En determinadas realizaciones, el conjugado se administra una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, seis veces a la semana, o siete veces a la semana. En realizaciones preferidas, el conjugado se administra al menos tres veces a la semana. En otras realizaciones preferidas, el compuesto se administra diariamente durante cinco días consecutivos, o diariamente durante siete días consecutivos. En otras realizaciones, el conjugado se administra una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, o cinco veces al día. En realizaciones preferidas, el conjugado se administra tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas. En algunas realizaciones, cada vez que se administra el conjugado, se administra en una dosis de $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día o más. En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, o quince ciclos.

En aspectos específicos de esta realización, el conjugado se puede administrar en una dosis de $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día o más. En otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día a aproximadamente $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En todavía otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día a aproximadamente $9 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En todavía otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día a aproximadamente $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado se puede administrar en una dosis de aproximadamente $5,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día, o en una dosis de aproximadamente $7,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día, o en una dosis de aproximadamente $9,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día, o en una dosis de aproximadamente $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En un aspecto específico, el conjugado se puede administrar en una dosis que es la dosis máxima tolerada sin toxicidad excesiva, o por debajo de la misma. En realizaciones específicas, donde la enfermedad o trastorno es leucemia mieloide, la posología administrada está en un intervalo de más de $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día a aproximadamente $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. Las posologías diarias descritas en la presente memoria se pueden administrar en días consecutivos y/o no consecutivos. En una realización específica, se administra una posología diaria en días no consecutivos a lo largo de una semana, por ejemplo, lunes, miércoles y viernes. En otra realización específica, se administra una posología diaria en días consecutivos a lo largo de una semana, por ejemplo, lunes, martes, miércoles, jueves y viernes.

En aspectos específicos de esta realización, el conjugado se puede administrar en una dosis de $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día o más. En otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día a aproximadamente $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En todavía otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día a aproximadamente $9 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En todavía otros aspectos, el conjugado se puede administrar en una dosis en un intervalo de aproximadamente $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día a aproximadamente $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado se puede administrar en una dosis de aproximadamente $5,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día, o en una dosis de aproximadamente $7,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día, o en una dosis de aproximadamente $9,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día, o en una dosis de aproximadamente $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ al día. En un aspecto específico, el conjugado se puede administrar en una dosis que es la dosis máxima tolerada sin toxicidad excesiva, o por debajo

de la misma. En realizaciones específicas, donde la enfermedad o trastorno es leucemia mieloide, la posología administrada está en un intervalo de más de 4 µg/kg a aproximadamente 20 µg/kg.

En otra realización, donde la enfermedad es síndrome mielodisplásico, la posología administrada es al menos 4 µg/kg o más.

En algunas realizaciones de la presente invención, la posología de un conjugado o composición farmacéutica administrado es al menos 1,5; 1,6; 1,8; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 o 100 veces menor que la dosis máxima tolerada (DMT) durante un periodo de una semana, dos semanas, un mes, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más.

En algunas realizaciones de la presente invención, la posología de un conjugado o composición farmacéutica administrado es al menos 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,8; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 o 100 veces menor que la dosis equivalente en humanos (DEH) del nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) durante un periodo de una semana, dos semanas, un mes, tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más. Véase la exposición en la Sección 5.3, arriba.

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

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

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

En una realización preferida, la posología de conjugado administrada a un sujeto para tratar, prevenir y/o controlar el cáncer en un paciente es una dosis de 4 µg/kg, 5,32 µg/kg, 7,07 µg/kg, 9,4 µg/kg, o 12,5 µg/kg del peso corporal del sujeto, administrada tres veces a la semana, durante un periodo de dos semanas. En un aspecto específico de esta realización, el conjugado de la presente invención se administra todos los días durante cinco días. En otras realizaciones, la dosificación se puede repetir durante múltiples ciclos, en donde el número de ciclos elegido puede o no incluir o no la medición de anticuerpos anti-DT en el paciente.

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

En una realización específica, la posología de un conjugado administrado a un sujeto para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer en un paciente está en el intervalo de 0,01 a 10 g/m², y más habitualmente, en el intervalo de 0,1 g/m² a 7,5 g/m², de la superficie corporal del sujeto. En una realización, la posología administrada a un sujeto está en el intervalo de 0,5 g/m² a 5 g/m², o 1 g/m² a 5 g/m² de la superficie corporal del sujeto.

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

En otras realizaciones, la pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz comprende administrar a un paciente una pluralidad de dosis de una cantidad eficaz de un conjugado de la presente invención, en donde la pluralidad de dosis

mantiene un nivel plasmático de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,15 µg/ml, al menos 0,17 µg/ml, al menos 0,2 µg/ml, al menos 0,23 µg/ml, al menos 0,25 µg/ml, al menos 0,3 µg/ml, al menos 0,34 µg/ml, al menos 0,4 µg/ml, al menos 0,45 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 1751 g/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml, o al menos 400 µg/ml del compuesto de la presente invención durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, o 24 meses.

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

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

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

En determinadas realizaciones, se monitoriza la respuesta de un paciente a una pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz midiendo las concentraciones séricas o plasmáticas de un conjugado de la presente invención a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, la pauta profiláctica y/o terapéutica se ajusta como resultado de los datos farmacocinéticos obtenidos. Por ejemplo, se puede ajustar la frecuencia y/o posología administrada al paciente. En algunas realizaciones, se monitoriza la respuesta de un paciente a una pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz evaluando la respuesta inmunitaria del paciente al conjugado administrado al paciente. En una realización específica, se monitoriza el título de anticuerpos antitoxina diférica (anti-DT) del paciente. Se pueden variar diversos aspectos de la pauta basándose en la comparación, que incluyen, pero no se limitan a, la posología y frecuencia de administración, y la pauta temporal de administración.

En algunas realizaciones, el título de anticuerpos anti-DT en un paciente se mide antes de la administración de un conjugado de la presente invención. El título de anticuerpos anti-DT pretratamiento se puede considerar para determinar la idoneidad de un paciente para recibir un conjugado de la presente invención, o la pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz administrada al paciente. Por ejemplo, el título de anticuerpos anti-DT de un paciente puede sugerir administrar un conjugado de la presente invención en una posología particular, con una frecuencia particular y/o durante un determinado periodo de tiempo.

En algunas realizaciones, la pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz comprende la administración de un conjugado de la presente invención en combinación con uno o más tratamientos terapéuticos contra el cáncer adicionales. Véase la Sección 5.3.2. Preferiblemente, las posologías del uno o más tratamientos terapéuticos contra el cáncer adicionales utilizados en la terapia combinada son inferiores a las que se han utilizado o se están utilizando actualmente para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer. Las posologías recomendadas del uno o más tratamientos terapéuticos contra el cáncer adicionales utilizados actualmente para la prevención, tratamiento y/o control del cáncer se pueden obtener de cualquier referencia en la técnica, lo que incluye, pero no se limita a, Hardman *et al.*, eds., *The Pharmacological Basis Of Basis Of Therapeutics* de Goodman y Gilman, 10.^a edición, Mc-Graw-Hill, Nueva York, 2001; *Physician's Desk Reference* (60.^a edición., 2006).

El conjugado de la presente invención y el uno o más tratamientos terapéuticos contra el cáncer adicionales se pueden administrar independientemente, simultáneamente, o secuencialmente. En diversas realizaciones, el compuesto de la presente invención y el tratamiento terapéutico contra el cáncer adicional se administran con menos de 5 minutos de diferencia, menos de 30 minutos de diferencia, menos de 1 hora de diferencia, con aproximadamente 1 hora de diferencia, aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, aproximadamente 2 horas a

aproximadamente 3 horas de diferencia, aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, aproximadamente 12 horas a 18 horas de diferencia, 18 horas a 24 horas de diferencia, 24 horas a 36 horas de diferencia, 36 horas a 48 horas de diferencia, 48 horas a 52 horas de diferencia, 52 horas a 60 horas de diferencia, 60 horas a 72 horas de diferencia, 72 horas a 84 horas de diferencia, 84 horas a 96 horas de diferencia, o 96 horas a 120 horas de diferencia. En una realización, se administran dos o más tratamientos terapéuticos contra el cáncer en la misma visita del paciente.

En determinadas realizaciones, el conjugado de la presente invención y el tratamiento terapéutico contra el cáncer adicional se administran cíclicamente. La terapia cíclica implica la administración de un primer tratamiento terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, seguida de la administración de un segundo tratamiento terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, y la repetición de esta administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a uno o ambos de los tratamientos terapéuticos contra el cáncer, para evitar o reducir los efectos secundarios de uno o ambos de los tratamientos terapéuticos contra el cáncer y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

En una realización preferida, los tratamientos terapéuticos contra el cáncer se administran simultáneamente a un sujeto en composiciones independientes. Los tratamientos terapéuticos contra el cáncer combinados se pueden administrar a un sujeto mediante la misma o diferentes vías de administración.

En una realización específica, la terapia cíclica implica la administración de un primer tratamiento terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, seguida de la administración de un segundo tratamiento terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, seguida de la administración de un tercer tratamiento terapéutico contra el cáncer durante un periodo de tiempo, y así sucesivamente, y la repetición de esta administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a uno o ambos de los tratamientos terapéuticos contra el cáncer, para evitar o reducir los efectos secundarios de uno o ambos de los tratamientos terapéuticos contra el cáncer y/o para mejorar la eficacia de los tratamientos terapéuticos contra el cáncer.

Cuando un conjugado de la presente invención y el tratamiento terapéutico contra el cáncer adicional se administran a un sujeto simultáneamente, el término “simultáneamente” no se limita a la administración de los tratamientos terapéuticos contra el cáncer exactamente al mismo tiempo, sino que está destinado a indicar que se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de modo tal que puedan actuar juntos (por ejemplo, sinérgicamente para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otro modo). Por ejemplo, los tratamientos terapéuticos contra el cáncer se pueden administrar al mismo tiempo o secuencialmente, en cualquier orden, en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, se deben administrar lo suficientemente próximos en el tiempo a fin de proporcionar el efecto terapéutico deseado, preferiblemente de forma sinérgica. Los tratamientos terapéuticos contra el cáncer combinados se pueden administrar independientemente, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. Cuando los componentes de las tratamientos terapéuticos contra el cáncer combinados no se administran en la misma composición farmacéutica, se entiende que se pueden administrar en cualquier orden a un sujeto con necesidad de los mismos. Por ejemplo, un conjugado se puede administrar antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas antes), simultáneamente a, o después de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) la administración del tratamiento terapéutico contra el cáncer adicional a un sujeto con necesidad del mismo. En diversas realizaciones, los tratamientos terapéuticos contra el cáncer se administran con un 1 minuto de diferencia, 10 minutos de diferencia, 30 minutos de diferencia, menos de 1 hora de diferencia, 1 hora de diferencia, 1 hora a 2 horas de diferencia, 2 horas a 3 horas de diferencia, 3 horas a 4 horas de diferencia, 4 horas a 5 horas de diferencia, 5 horas a 6 horas de diferencia, 6 horas a 7 horas de diferencia, 7 horas a 8 horas de diferencia, 8 horas a 9 horas de diferencia, 9 horas a 10 horas de diferencia, 10 horas a 11 horas de diferencia, 11 horas a 12 horas de diferencia, no más de 24 horas de diferencia, o no más de 48 horas de diferencia. En una realización, los tratamientos terapéuticos contra el cáncer se administran en la misma visita a la consulta. En otra realización, los tratamientos terapéuticos contra el cáncer combinados se administran con un 1 minuto a 24 horas de diferencia.

5.3.2 Tipos de enfermedades y trastornos

Se describen métodos para tratar, prevenir o controlar una enfermedad o trastorno caracterizada por células que expresan la subunidad beta del receptor de IL-3 en humanos administrando a humanos con necesidad de dicho tratamiento o prevención una composición farmacéutica que comprende una cantidad de conjugado de IL-3-toxina diférica eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno. En determinados aspectos, la enfermedad o el trastorno no es un cáncer hematológico. En otros, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

Se describen métodos para prevenir, tratar, controlar y/o mitigar un trastorno inflamatorio, o uno o más síntomas del mismo, como alternativa a otras terapias convencionales. En realizaciones específicas, el paciente que está siendo tratado o controlado de conformidad con los métodos descritos es resistente a otras terapias o es propenso a reacciones adversas de dichas terapias. El paciente puede ser una persona con un sistema inmunitario suprimido (por ejemplo, pacientes posoperatorios, pacientes en quimioterapia y pacientes con inmunodeficiencia, pacientes con displasia broncopulmonar, pacientes con cardiopatía congénita, pacientes con fibrosis quística, pacientes con cardiopatía congénita o adquirida, y pacientes que padecen una infección), una persona con insuficiencia renal o hepática, personas de edad avanzada, niños, lactantes, lactantes nacidos prematuramente, personas con trastornos neuropsiquiátricos o que toman fármacos psicotrópicos, personas con antecedentes de convulsiones, o personas que toman medicamentos que interactuarían negativamente con agentes convencionales utilizados para prevenir, controlar, tratar o mitigar una infección respiratoria viral o uno o más síntomas de la misma (no forma parte de la invención).

Se describen enfermedades que están caracterizadas por células dendríticas plasmocitoides, las cuales que presentan alta expresión de la cadena alfa del receptor de IL-3. Dichas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, VIH, herpes, CMV, enfermedades autoinmunitarias, y cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, linfoma blástico de NK, cáncer de células dendríticas, que incluye cáncer de células dendríticas plasmocitoides, y neoplasias dermatológicas.

Trastornos autoinmunitarios (no forman parte de la presente invención)

Se describe un método para prevenir, tratar, controlar y/o mitigar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas del mismo, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de la misma una dosis de una cantidad eficaz de una o más composiciones farmacéuticas, en donde las células implicadas en dichos trastornos expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3. En los trastornos autoinmunitarios, el sistema inmunitario desencadena una respuesta inmunitaria y el sistema inmunitario, normalmente protector del cuerpo, causa daño a sus propios tejidos atacándose a sí mismo por error. Hay muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan al cuerpo de diferentes maneras. Por ejemplo, el cerebro se ve afectado en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se ve afectado en personas con enfermedad de Crohn, y la membrana sinovial, el hueso y el cartílago de diversas articulaciones se ven afectados en individuos con artritis reumatoide. A medida que progresan los trastornos autoinmunitarios, se puede producir la destrucción de uno o más tipos de tejidos del cuerpo, el crecimiento anómalo de un órgano, o cambios en la función de los órganos. El trastorno autoinmunitario puede afectar solo a un tipo de órgano o tejido, o puede afectar a múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos habitualmente afectados por trastornos autoinmunitarios incluyen los glóbulos rojos, los vasos sanguíneos, los tejidos conjuntivos, las glándulas endocrinas (por ejemplo, tiroides o páncreas), los músculos, las articulaciones y la piel.

Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que se pueden prevenir, tratar, controlar y/o mitigar mediante los métodos descritos incluyen, pero no se limitan a, resistencia a fármacos adrenérgicos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, encefalomiелitis alérgica, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ovaritis y orquitis autoinmunitaria, trombocitopenia autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampuloso, miocardiopatía, síndrome poscardiotomía, celiaquía-dermatitis, hepatitis activa crónica, síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica (SFC), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad por crioaglutininas, enfermedad de Crohn, enfermedad por depósitos densos, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), enteropatía por intolerancia al gluten, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, hipertiroidismo (es decir, tiroiditis de Hashimoto), fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de Addison idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, miocarditis, diabetes mellitus inmunomediada de tipo 1, neuritis, insuficiencia de otras glándulas endocrinas, penfigoide vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, policondritis, poliendocrinopatías, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, síndrome post-IM, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, policondritis recidivante, síndrome de Reiter, cardiopatía reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, urticaria, uveítis, uveítis oftalmológica, vasculitis, tales como vasculitis por dermatitis herpetiforme, vitiligo, y granulomatosis de Wegener.

Alergias (no forman parte de la presente invención)

Se describe un método para prevenir, tratar, controlar y/o mitigar una o más enfermedades alérgicas o uno o más síntomas de las mismas, en donde las células implicadas en dichas enfermedades o alergias expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de la misma una dosis de una cantidad eficaz de una o más composiciones farmacéuticas. Las reacciones alérgicas (hipersensibilidad) inmunomediadas se clasifican en cuatro tipos (I-IV) según los mecanismos subyacentes que

conducen a la manifestación de los síntomas alérgicos. Las reacciones alérgicas de tipo I son reacciones de hipersensibilidad inmediatas caracterizadas por la liberación mediada por IgE de sustancias vasoactivas, tales como histamina, desde los mastocitos y basófilos. Durante horas, los mastocitos y basófilos liberan citocinas proinflamatorias que producen vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, hipersecreción glandular, espasmo del músculo liso, e infiltración tisular con eosinófilos y otras células inflamatorias.

Las reacciones alérgicas de tipo II son reacciones de hipersensibilidad citotóxicas e implican anticuerpos anti-IgG o IgM unidos a antígenos de superficie de las células, con fijación posterior del complemento. Determinadas células citotóxicas, tales como las células T citotóxicas o los macrófagos, se activan, se unen a las células recubiertas con IgG y destruyen las células diana. Las reacciones de tipo II pueden dar como resultado citólisis o daño tisular.

Las reacciones de tipo III son reacciones de complejos inmunitarios como resultado de depósitos de complejos inmunitarios de antígeno-anticuerpo circulantes en los vasos sanguíneos o los tejidos. La inflamación se produce como resultado de la iniciación por el complejo inmunitario de una secuencia de acontecimientos que da como resultado la migración de células polimorfonucleares y la liberación de enzimas proteolíticas lisosómicas y factores de permeabilidad en los tejidos.

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

Las reacciones alérgicas pueden ser inmediatas, tardías o crónicas. La exposición continua o crónica a un alérgeno puede dar como resultado una inflamación alérgica crónica. Los tejidos de los sitios de inflamación crónica contienen eosinófilos y células T que liberan mediadores que pueden causar daño tisular, aumento de la inflamación y aumento de la sensibilidad.

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

Cáncer

Cualquier tipo de cáncer en el que las células madre cancerosas o las células cancerosas expresan las subunidades alfa y/o beta del receptor de interleucina-3 se puede prevenir, tratar y/o controlar. Los ejemplos no limitantes de cánceres que se pueden prevenir, tratar y/o controlar incluyen: leucemias, tales como, pero no limitadas a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, monomielocíticas, monocíticas y eritroleucemia, y síndrome mielodisplásico; leucemias crónicas, tales como, pero no limitadas a, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, tricoleucemia; policitemia vera; linfomas, tales como, pero no limitados a enfermedad de Hodgkin, enfermedad no hodgkiniana; mielomas múltiples, tales como, pero no limitados a, mieloma múltiple quiescente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia plasmocítica, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significación indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de las cadenas pesadas; cáncer de células dendríticas, que incluye cáncer de células dendríticas plasmocitoides, linfoma NK blástico (también denominado linfoma de NK/células T cutáneo y neoplasias dermatológicas (CD4+/CD56+) agranulares); leucemia basofílica; sarcomas óseos y del tejido conjuntivo, tales como, pero no limitados a, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma periostático, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales, tales como, pero no limitados a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor, no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama, que incluye, pero no se limita a, carcinoma ductal, adenocarcinoma, carcinoma lobular (microcítico), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cánceres suprarrenales, tales como, pero no limitados a, feocromocitoma y carcinoma corticosuprarrenal; cáncer de tiroides, tal como, pero no limitado a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático, tal como, pero no limitado a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o insulinoma; cánceres hipofisarios, tales como, pero no limitados a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares, tales como, pero no limitados a, melanoma ocular, tal como melanoma de iris, melanoma coroideo y melanoma de cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales, tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar, tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino, tales como, pero no limitados a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos, tales como, pero no limitados a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres ováricos, tales como, pero no limitados a, carcinoma epitelial ovárico, tumor con potencial de malignidad, tumor de células germinativas y tumor estroma;

cánceres esofágicos, tales como, pero no limitados a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (microcítico); cánceres de estómago, tales como, pero no limitados a, adenocarcinoma, linfoma, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma fungosos (polipoides), ulcerativos, de
 5 de diseminación superficial, de diseminación difusa malignos; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado, tales como, pero no limitados a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula, tales como adenocarcinoma; colangiocarcinomas, tales como, pero no limitados a, papilares, nodulares y difusos; cánceres de pulmón, tales como cáncer de pulmón amicrocítico, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma macrocítico y cáncer de pulmón microcítico; cánceres testiculares, tales como, pero no
 10 limitados a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminomatoso, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma (tumor del seno endodérmico); cánceres de próstata, tales como, pero no limitados a, neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rabiomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales, tales como, pero no limitados a, carcinoma de células escamosas; cánceres basal; cánceres de las glándulas salivales, tales como, pero no limitados a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma quístico adenoide; cánceres de faringe, tales como, pero no limitados a, cáncer de células escamosas, y verrugoso;
 15 cánceres de piel, tales como, pero no limitados a, carcinoma de células basales. carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón, tales como, pero no limitados a carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga, tales como, pero no limitados a, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangoendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para consultar dichos trastornos, véase Fishman *et al.*, 1985, Medicine, 2.^a edición, J.B. Lippincott Co., Filadelfia, y Murphy *et al.*, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Las pautas profiláctica y/o terapéuticamente eficaces también son útiles en el tratamiento, prevención y/o control de un abanico de cánceres u otras enfermedades proliferativas anómalas en donde las células de dichas enfermedades expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, que incluyen (pero no se limitan a) las siguientes: carcinoma, que incluye el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; lo que incluye carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfóide, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas, y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rabiomiosarcoma; otros tumores, que incluyen melanoma, seminoma, teratocarcinoma, neuroblastoma y glioma; tumores del sistema nervioso central y periférico, que incluyen astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma, rabiomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xerodermia pigmentosa, queratoactantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma (que no forman parte de la presente invención). En algunos aspectos, se previenen, tratan y/o controlan cánceres asociados a aberraciones en la apoptosis.

Dichos cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores hormonodependientes de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas, tales como poliposis adenomatosa familiar, y síndromes mielodisplásicos. En aspectos específicos, se previenen, tratan y/o controlan cambios de malignidad o disproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos de la piel, pulmón, hígado, hueso, cerebro, estómago, colon, mama, próstata, vejiga, riñón, páncreas, ovario y/o útero de conformidad con los métodos. En otros aspectos específicos, se previene, trata y/o controla un sarcoma, melanoma o leucemia de conformidad con los métodos descritos. En determinadas realizaciones, el cáncer es leucemia mielóide aguda (LMA). En determinados otros aspectos, los sujetos tienen síndrome mielodisplásico (SMD). En la presente invención, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). En otras realizaciones específicas, se previene, trata y/o controla el síndrome mielodisplásico.

5.3.3 Poblaciones de pacientes objetivo

Las composiciones farmacéuticas se administran a humanos con necesidad de inhibición de células que expresan la subunidad alfa (en realizaciones específicas, las subunidades alfa y beta) de la interleucina.3. En determinadas realizaciones, se inhibe el crecimiento de dichas células. En otros aspectos, los conjugados se administran a humanos con enfermedades y trastornos asociados a sobreexpresión del receptor de IL-3. En determinados aspectos, el sujeto sí padece leucemia mielóide. En otros aspectos, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno alérgico. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmunitaria. En determinadas realizaciones, los sujetos tienen leucemia mielógena aguda (LMA). En determinados otros aspectos, los sujetos tienen síndrome mielodisplásico (SMD). En la presente invención, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

Las composiciones farmacéuticas se administran a sujetos que desarrollan, han desarrollado o se espera que desarrollen cáncer (por ejemplo, sujetos con una predisposición genética a un tipo particular de cáncer, sujetos que

han estado expuestos a un carcinógeno, sujetos con cáncer recién diagnosticado, sujetos cuyo tratamiento para el cáncer ha fracasado, sujetos que han recidivado de cáncer, o sujetos que están en remisión de un cáncer particular). Dichos sujetos pueden haber sido o no tratados previamente para el cáncer, o pueden estar en remisión, haber recidivado, o su tratamiento puede haber fracasado. Dichos pacientes también pueden tener citogenética anómala.

Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar como cualquier línea de terapia contra el cáncer, por ejemplo, una primera línea, segunda línea o tercera línea de terapia contra el cáncer. En una realización específica, el sujeto que va a recibir o está recibiendo una composición farmacéutica está recibiendo o ha recibido otras terapias contra el cáncer. En otra realización, el sujeto que va a recibir una composición farmacéutica está recibiendo otras terapias contra el cáncer, y las composiciones farmacéuticas se administran al sujeto antes de que se presenten cualesquiera efectos adversos o intolerancia a estas otras terapias contra el cáncer. En una realización alternativa, el sujeto que va a recibir o está recibiendo una composición farmacéutica no ha recibido o no está recibiendo otras terapias contra el cáncer.

En un aspecto específico, el sujeto ha sido diagnosticado de cáncer utilizando técnicas conocidas para un experto en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen de mama, examen de ganglios linfáticos, examen abdominal, vigilancia de la piel, exploración testicular, palpación general), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), citología vaginal (cáncer de cuello uterino), sangre oculta en heces, pruebas de sangre (por ejemplo, prueba de hemograma completo (CBC), prueba de antígeno prostático específico (PSA), prueba de antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba de antígeno del cáncer (CA)-125, alfafetoproteína (AFP), pruebas de función hepática), análisis de cariotipado, análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de neoplasias malignas hematológicas), histología, citología, citometría de flujo, análisis de esputo, y métodos de adquisición de imágenes (por ejemplo, tomografía computarizada (TC), adquisición de imágenes de resonancia magnética (IRM), ecografía, adquisición de imágenes de rayos X, mamografía, TEP, gammagrafías con radionúclidos, gammagrafías óseas). Los sujetos pueden haber sido tratados o no previamente para el cáncer.

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

En una realización, se administra una composición farmacéutica a un sujeto después de un ciclo de terapia con el objetivo de matar células cancerosas. En algunas realizaciones, el ciclo de la terapia implica la administración de dosis en bolo de agentes quimioterapéuticos y/o dosis en bolo de radioterapia. En una realización específica, se administra una composición farmacéutica a un sujeto después de que el sujeto haya recibido un ciclo de terapia que implica una dosis que es la dosis máxima tolerada o el nivel de dosis sin efecto adverso observado de uno o más agentes quimioterapéuticos y/o radioterapia, o está por debajo de lo mismo.

En determinadas realizaciones, se administra una composición farmacéutica a un sujeto como una alternativa a la quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía, terapia con moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia epigenética, radioinmunoterapia, terapia dirigida y/o terapia biológica, que incluye inmunoterapia, donde la terapia ha resultado o puede resultar demasiado tóxica, es decir, da como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables para el sujeto. En algunas realizaciones, se administra una pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz a un sujeto que es propenso a reacciones adversas de otras terapias contra el cáncer. El sujeto puede, por ejemplo, tener un sistema inmunitario suprimido (por ejemplo, pacientes posoperatorios, pacientes en quimioterapia y pacientes con inmunodeficiencia), tener insuficiencia renal o hepática, ser de edad avanzada, ser un niño, ser un lactante, tener un trastorno neuropsiquiátrico, tomar un fármaco psicotrópico, tener antecedentes de convulsiones, o estar tomando medicamentos que interactuarían negativamente con las terapias contra el cáncer.

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

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

En determinadas realizaciones, se administra una composición farmacéutica a un sujeto resistente a una o más terapias. En una realización, que un cáncer sea resistente a una terapia significa que al menos alguna porción significativa de las células cancerosas no mueren o su división celular no se detiene. La determinación de si las células cancerosas son resistentes se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica para ensayar la eficacia de una terapia sobre células cancerosas, utilizando los significados aceptados en la técnica de

“resistente” en dicho contexto. En diversas realizaciones, un cáncer es resistente cuando la cantidad de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o ha aumentado. En otras realizaciones, que un cáncer sea resistente significa que al menos alguna porción significativa de células madre cancerosas no mueren o su división celular no se detiene. La determinación de si las células madre cancerosas son resistentes se puede realizar *in vivo* o *in vitro* mediante cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se administra una composición farmacéutica para revertir la resistencia o aumentar la sensibilidad a determinados agentes hormonales, radioterapéuticos y quimioterapéuticos, resensibilizando de ese modo las células cancerosas a uno o más de estos agentes que, a continuación, se pueden administrar (o seguir administrando) para tratar o controlar el cáncer, lo que incluye prevenir metástasis. En una realización específica, las pautas descritas se administran a pacientes con niveles elevados de la citocina IL-6, que se ha asociado al desarrollo de resistencia de las células cancerosas a diferentes pautas de tratamiento, tales como quimioterapia y terapia hormonal.

En algunas realizaciones, se administra una composición farmacéutica a un sujeto con un recuento de linfocitos absoluto medio de al menos aproximadamente 400 células/mm³, al menos 500 células/mm³, al menos aproximadamente 600 células/mm³, al menos aproximadamente 700 células/mm³, al menos aproximadamente 800 células/mm³, al menos aproximadamente 900 células/mm³, al menos aproximadamente 1000 células/mm³, al menos aproximadamente 1100 células/mm³, al menos aproximadamente 1200 células/mm³. En otras realizaciones, se administra una pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz a un sujeto con un recuento de linfocitos absoluto medio de aproximadamente 400 células/mm³ a aproximadamente 1200 células/mm³, aproximadamente 500 células/mm³ a aproximadamente 1200 células/mm³, aproximadamente 600 células/mm³ a aproximadamente 1200 células/mm³, aproximadamente 700 células/mm³ a aproximadamente 1200 células/mm³, aproximadamente 800 células/mm³ a aproximadamente 1200 células/mm³, aproximadamente 900 células/mm³ a aproximadamente 1200 células/mm³, aproximadamente 1000 células/mm³ a aproximadamente 1200 células/mm³. En una realización más específica, la pauta da como resultado un recuento de linfocitos absoluto medio de al menos aproximadamente 400 células/mm³.

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

5.3.4 Terapias combinadas

También se describen métodos para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer, comprendiendo los métodos administrar a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) con necesidad de la misma una pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz, comprendiendo la pauta administrar al paciente una composición farmacéutica y una o más terapias adicionales, no siendo dicha terapia adicional un conjugado. En una realización específica, las terapias combinadas descritas en la presente comprenden una composición farmacéutica y al menos otra terapia que tiene el mismo mecanismo de acción que dicho conjugado. En otra realización específica, las terapias combinadas comprenden una composición farmacéutica identificada de conformidad con los métodos descritos y al menos otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente a dicho conjugado. La composición farmacéutica y la terapia adicional se pueden administrar independientemente, simultáneamente, o secuencialmente. La combinación de agentes puede actuar de forma aditiva o sinérgica. Las terapias combinadas de la presente invención reducen los efectos secundarios asociados a las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos).

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas independientes. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto mediante la misma vía de administración o vías diferentes.

Cualquier terapia (por ejemplo, agente terapéutico o profiláctico) que sea útil, se haya utilizado, o se esté utilizando actualmente para la prevención, el tratamiento y/o el control del cáncer se puede utilizar en composiciones y métodos descritos. Las terapias (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos) incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, conjugados, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Los ejemplos no limitantes de terapias contra el cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía, terapia con moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia epigenética, radioinmunoterapia, terapia dirigida y/o terapia biológica, que incluye inmunoterapia. En determinadas realizaciones, una pauta profiláctica y/o terapéuticamente eficaz comprende la administración de una combinación de terapias.

Los ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; amsacrina; anastrozol; antraciclina; antrammina; asparaginasa; asperlina; azacitidina (Vidaza); azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bisfosfonatos (por ejemplo, pamidronato (Aredia), clondronato de sodio (Bonefos), ácido zoledrónico (Zometa), alendronato (Fosamax), etidronato, ibandomato, cimadronato, risedromato y tiludromato); bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímoro; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina (Ara-C); dacarbacina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina (Dacogen); agentes de desmetilación, dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; inhibidores de EphA2; elsamitruccina; 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; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; inhibidores de histona desacetilasas (HDAC) clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofofina; mesilato de imatinib (Gleevec, Glivec); interleucina II (que incluye interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; iroplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; lenalidomida (Revlimid); letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, sipilizumab (MedImmune Inc.; publicación internacional n.º WO 02/098370)); acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitospero; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxaliplatino; oxisurán; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfano; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfíromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; sparfosato sódico; sorafenib; sparfosato sódico; sparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiampirina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina.

Otros ejemplos de terapias contra el cáncer incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de TC-LLA; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogénica antidorsalización; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina deaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados betalactámicos; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasas (ICOS); castanoespermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinolaxina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; octofostato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshdrodidemina B; deslorelinea; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diazicuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol; dioxamicina; difenil espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflomitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestane; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafrina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasas; gemcitabina; inhibidores de glutatión; inhibidores de la HMG-CoA-reductasa (por ejemplo, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lescol, lupitor, lovastatina, rosuvastatina y simvastatina); hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandronico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofofina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento insulinoide 1; agonistas de interferones; interferones; interleucinas; iobenguano; iododoxorubicina; ipomeanol, 4-roplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina;

lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; LFA-3TIP (Biogen, Cambridge, MA; publicación internacional n.º WO 93/0686 y patente de EE. UU. n.º 6,162,432); liarzol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipofílico; compuestos de platino lipofílicos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; 5 losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecán; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilsina; inhibidores de metaloproteínas de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario con errores de emparejamiento; mitoguazona; octolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos de mitotoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, 10 gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + pared celular micobacteriana sk; mopidamol; inhibidor de genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia a base de múltiples supresores tumorales 1; agente contra el cáncer de mostazas; micaperoxisa B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetilalinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido nerindrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; 15 antioxidante de nitrógeno; nitulina; O6-bencilguanina; octeotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citocinas; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelitina; pegaspargasa; peldesina; pentosano polisulfato de sodio; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de 20 fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor de activadores del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfíromicina; prednisona; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunitario a base de proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C; inhibidores de la proteína cinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de la purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; 25 pirazoloacridina; conjugado de hemoglobina piridoxilada y polioxitileno; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de la farnesil proteína transferasa de ras; inhibidores de ras; inhibidores de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor derivado de senescencia 1; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión a antígeno monocatenaria; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato de 30 sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiatrina 1; escualamina; inhibidores de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiámina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista peptídico intestinal vasoactivo hiperactivo; Suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; 35 5-fluorouracilo; leucovorina; tamoxifeno metiodida; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasas; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de la tiroides; estaño etilo etiopurpurina; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; 40 triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina cinasas; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; inhibidor del factor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de urocina; vapreotida; variolina B; sistema vectorial, terapia génica eritrocítica; talidomida; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; VITAXIN™ (véase la patente de EE. UU. de n.º de publicación US 2002/0168360 A1, fechada a 14 de noviembre de 2002, titulada "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ Antagonists in Combination With Other Prophylactic or 45 Therapeutic Agents"); vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalámero.

Una lista no limitante de compuestos que se podrían utilizar para dirigirse a células madre cancerosas incluye: inhibidores del receptor de interleucina-3 (IL-3R) y CD123 (lo que incluye péptidos, conjugados de péptidos, 50 anticuerpos, conjugados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y conjugados de fragmentos de anticuerpos que se dirigen a IL-3R o CD123); cantaridina; norcantaridina y análogos y derivados de la misma; Inhibidores de la vía Notch, que incluyen inhibidores de la gamma-secretasa; inhibidores de la vía Sonic hedgehog/Smoothed, que incluyen ciclopamina y análogos de la misma; anticuerpos contra CD96; determinados inhibidores de NF- κ B/proteosoma, que incluyen partenolida y análogos de la misma; determinados triterpenos, que incluyen celastrol; 55 determinados inhibidores de mTOR; compuestos y anticuerpos que se dirigen al receptor de urocina; sinefungina; determinados inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH); agonistas y antagonistas de PPAR-alfa y PPAR-gamma (que incluyen pioglitazona, tesaclitazar, muraglitazar, peligitazar, lobeglitazona, balaglitazona, ragaglitazar, rosigitazona, farglitazar, sodelglitazar, reglitazar, naveglitazar, oxeglitazar, metaglitazén, netoglitazona, darglitazona, englitazona, tiazolidinedionas, aleglitazar, edaglitazona, rivoglitazona, troglitazona, imigitazar y sipoglitazar); inhibidores de la telomerasa; anticuerpos contra EpCAM (ESA); Agonistas y antagonistas de GSK-3 beta (que incluyen litio, 6-bromoinirrubin-3'-oxima (BIO), TDZD8); inhibidores de la vía Wnt, que incluyen anticuerpos contra moléculas Frizzled o pequeñas que inhiben Dishevelled/Frizzled o beta-catenina; anticuerpos y conjugados anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan, Bexxar, Zevalin) para utilización novedosa en mieloma múltiple o melanoma; anticuerpo anti-CD133; anticuerpo anti-CD44; anticuerpos contra IL-4; determinados agentes de diferenciación, tales como 65 versnarinona; compuestos que se dirigen a CD33, tales como un anticuerpo o ácido betulínico; compuestos que se dirigen a lactadherina, tales como un anticuerpo; moléculas pequeñas o anticuerpos que se dirigen a CXCR4 o SDF-1;

pequeñas moléculas o anticuerpos que se dirigen a bombas de resistencia a múltiples fármacos; inhibidores de survivina; inhibidores de XIAP; moléculas pequeñas que se dirigen a Bcl-2; anticuerpos contra CLL-1; e inhibidores de furina (tales como cucurbitacinas).

- 5 Una lista no limitante adicional de compuestos que también se podrían utilizar para dirigirse a células madre cancerosas incluye i) anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, y proteínas, ya sea desnudas o conjugadas a un resto terapéutico, que se dirigen a determinadas dianas de la superficie de las células sobre células madre cancerosas, o
- 10 ii) moléculas pequeñas conocidas en la técnica, que incluyen aquellas que se pueden optimizar posteriormente (por ejemplo, mediante química) o identificar mediante un cribado a base de células madre cancerosas, (por ejemplo, tal como uno que determinaría si un compuesto altera la proliferación o viabilidad de una célula madre cancerosa
- 15 mediante métodos estándar, la superficie de las células y las dianas intracelulares, que incluyen (sin pretender ser exhaustivos): Rex1 (Zfp42), CTGF, activina A, Wnt, FGF-2, HIF-1, AP -2 gamma, Bmi-1, nucleostemina, hiwi, Moz-TIF2, Nanog, beta-arrestina-2, Oct-4, Sox2, stella, GDF3, RUNX3, EBAF, TDGF-1, nodal, ZFPY, PINE, Evi-1, Pax3, Mcl-1, c-kit, Lex-1, Zfx, lactadherina, aldehído deshidrogenasa, BCRP, telomerasa, CD133, Bcl-2, CD26, Gremlin, y FoxC2.

En algunas realizaciones, la terapia o terapias utilizadas en combinación con un compuesto de la presente divulgación son un agente inmunomodulador. Los ejemplos no limitantes de agentes inmunomoduladores incluyen agentes

20 proteínicos, tales como citocinas, peptidomiméticos, y anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)2, o fragmentos de unión a epítomos), moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico antisentido y triples hélices), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. En particular, los agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina,

25 antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrólimus)), metilprednisolona (MP), corticoesteroides, esteroides, micofenolato de mofetilo, rapamicina (sirólimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malonitriloamidas (por ejemplo, leflunamida), moduladores de receptores de células T, moduladores de receptores de citocinas y moduladores de mastocitos. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes inmunomoduladores, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. n.º 2005/0002934 A1, en los párrafos 259-275. En una realización, el agente inmunomodulador es un agente

30 quimioterapéutico. En una realización alternativa, el agente inmunomodulador es un agente inmunomodulador distinto de un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, la terapia o terapias utilizadas no son un agente inmunomodulador.

En algunas realizaciones, la terapia o terapias utilizadas en combinación con un compuesto de la presente divulgación son un agente antiangiogénico. Los ejemplos no limitantes de agentes antiangiogénicos incluyen proteínas,

35 polipéptidos, péptidos, conjugados, anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fvs, ScFvs, fragmentos Fab, fragmentos F(ab)2, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos), tales como anticuerpos que se unen específicamente a TNF- α , moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas antisentido o triples hélices), moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, y moléculas pequeñas que reducen o inhiben la angiogénesis. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes antiangiogénicos, por ejemplo, en

40 la publicación de EE. UU. n.º 2005/0002934 A1, en los párrafos 277-282. En otras realizaciones, la terapia o terapias utilizadas no son un agente antiangiogénico.

En algunas realizaciones, la terapia o terapias utilizadas en combinación con un compuesto de la presente divulgación son un agente antiinflamatorio. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen cualquier agente

45 antiinflamatorio, lo que incluye agentes útiles en terapias para trastornos inflamatorios, bien conocidos para un experto en la materia. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, anticolinérgicos (por ejemplo, sulfato de atropina, metilnitrato de atropina y bromuro de ipratropio (ATROVENT™)), agonistas beta-2 (por ejemplo, abuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutalina (BRETHAIRE™ y BRETHINE™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™, y VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™), y salmeterol (SEREVENT™ y SEREVENT DISKUS™)), y metilxantinas (por

50 ejemplo, teofilina (UNIPHYL™, THEO-DUR™, SLO-BID™, y TEHO-42™)). Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketorolaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Dichos AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticoesteroides (por ejemplo, metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISONE™ y DELTASONE™),

60 prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, e inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Se pueden encontrar otros ejemplos de agentes antiinflamatorios, por ejemplo, en la publicación de EE. UU. n.º 005/0002934 A1, en los párrafos 290-294. En otras realizaciones, la terapia o terapias utilizadas no son un agente antiinflamatorio.

65 En determinadas realizaciones, la terapia o terapias utilizadas son un agente alquilante, una nitrosourea, un antimetabolito, y antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa II, o un inhibidor mitótico. Los agentes alquilantes

incluyen, pero no se limitan a, busulfano, cisplatino, carboplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, decarbazina, mecloretamina, melfalán y temozolomida. Las nitrosoureas incluyen, pero no se limitan a, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU). Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, capecitabina, metotrexato, gemcitabina, citarabina y fludarabina. Las antraciclinas incluyen, pero no se limitan a, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina y mitoxantrona. Los inhibidores de la topoisomerasa II adecuados incluyen, pero no se limitan a, topotecán, irinotecán, etopósido (VP-16) y tenipósido. Los inhibidores mitóticos incluyen, pero no se limitan a, taxanos (paclitaxel, docetaxel) y alcaloides de vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina).

Se describe la utilización de agentes que se dirigen a células madre cancerosas en combinación con un compuesto de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el agente utilizado es un agente que se une a un marcador, por ejemplo, antígeno sobre células madre cancerosas. En una realización específica, el agente se une a un antígeno que es expresado a un nivel mayor sobre células madre cancerosas que sobre células madre normales. En una realización específica, el agente se une específicamente a un antígeno de células madre cancerosas. En otras realizaciones, la terapia o terapias descritas son un agente que se une a un marcador sobre células madre cancerosas. Los ejemplos no limitantes de antígenos sobre células madre cancerosas que se pueden utilizar para dirigirse a células madre cancerosas incluyen CD34+/CD38-, CD34+/CD38-/CD123+, CD44+/CD24-, CD133+, CD34+/CD10-/CD19-, CD138-/CD34-/CD19+, CD20+, CD133+/RC2+ y CD44+/a2 β 1hi/C133+. En una realización, el agente que se une a un marcador sobre células madre cancerosas es un anticuerpo. En otra realización, el agente que se une a un marcador sobre células madre cancerosas es un ligando. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o ligando está fijado directa o indirectamente a un resto terapéutico. Los ejemplos no limitantes de restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, un esteroide, arabinósido de citosina, fluorouracilo, metotrexato, aminopterina, mitomicina C, demecolcina, etopósido, mitramicina, caliqueamicina, CC-1065, clorambucilo o melfalán), radionúclidos, enzimas terapéuticas, citocinas, toxinas, que incluyen las toxinas derivadas de plantas, toxinas derivadas de hongos, toxinas derivadas de bacterias (por ejemplo, cadena A de ricina desglucosilada, una proteína inactivadora de ribosomas, alfa-sarcina, aspergilina, restirictocina, una ribonucleasa, una toxina diftérica, una exotoxina de *Pseudomonas*, una endotoxina bacteriana o el resto de lípido A de una endotoxina bacteriana), moduladores del crecimiento y ARNasa.

Por ejemplo, en una realización específica, el agente se une específicamente al receptor de IL-3 (IL-3R). En algunas realizaciones, el agente que se une al IL-3R es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es específico para IL-3R. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está conjugado químicamente o mediante tecnología recombinante a un resto terapéutico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, una toxina derivada de plantas, hongos o bacterias, un radionúclido) utilizando un agente enlazador para lograr una respuesta de muerte celular. En determinadas realizaciones, el anticuerpo, conjugado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o conjugado de fragmento de anticuerpo se une a la subunidad α de IL-3R (es decir, el antígeno CD123). En otras realizaciones, el anticuerpo, conjugado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o conjugado de fragmento de anticuerpo se une al IL-3R, que contiene las subunidades tanto α como β . Los métodos para preparar anticuerpos contra IL-3R y miméticos de anticuerpos contra IL-3R se describen en la patente de EE. UU. n.º 6,733,743 B2.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos que se unen a un marcador sobre células madre cancerosas son sustancialmente no inmunogénicos en el sujeto tratado. Los anticuerpos no inmunogénicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos quimerizados, anticuerpos humanizados, y anticuerpos de la misma especie que el sujeto que está recibiendo la terapia. Se pueden producir anticuerpos o fragmentos que se unen a marcadores en células madre cancerosas utilizando técnicas conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, los párrafos 539-573 de la publicación de EE. UU. n.º 2005/0002934 A1.

Se describe la utilización de agentes que se dirigen a células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, el agente actúa solo. En otras realizaciones, el agente está fijado directa o indirectamente a otro resto terapéutico. Los ejemplos no limitantes de restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, enzimas terapéuticas, agentes quimioterapéuticos, citocinas, radionúclidos, toxinas, ARNasa y antimetabolitos. En algunas realizaciones, el agente utilizado es un agente que se une a un marcador, por ejemplo, un antígeno sobre una célula madre cancerosa. En una realización específica, el agente se une a un antígeno que es expresado a un nivel mayor sobre células madre cancerosas que sobre células madre normales. En una realización específica, el agente se une específicamente a un antígeno de una célula madre cancerosa que no es una célula madre normal. En otras realizaciones, la terapia o terapias son un agente que se une a un marcador sobre células madre cancerosas. En una realización, el agente que se une a un marcador sobre células madre cancerosas es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo conjugado a un resto terapéutico, o un fragmento de anticuerpo conjugado a un resto terapéutico.

En algunas realizaciones, se utiliza un compuesto descrito en combinación con radioterapia, que comprende el uso de rayos X, rayos gamma y otras fuentes de radiación para destruir células madre cancerosas y/o células cancerosas. En realizaciones específicas, la radioterapia se administra como radiación de haces externa o teleterapia, en donde la radiación se dirige desde una fuente remota. En otras realizaciones, la radioterapia se administra como terapia interna o braquiterapia, en donde se coloca una fuente radiactiva dentro del cuerpo, cerca de células madre cancerosas, células cancerosas y/o una masa tumoral.

En algunas realizaciones, la terapia utilizada es una terapia basada en la proliferación. Los ejemplos no limitantes de dichas terapias incluyen una quimioterapia y radioterapia, como se han descrito arriba.

Las terapias contra el cáncer disponibles actualmente y sus posologías, vías de administración y utilización recomendadas se conocen en la técnica y se han descrito en dicha bibliografía, tal como en Physician's Desk Reference (60.ª edición, 2006). De conformidad con la presente invención, las posologías y frecuencia de administración de agentes quimioterapéuticos se han descrito arriba.

5.4 Métodos para monitorizar células madre cancerosas

Como parte de las pautas profilácticamente eficaces y/o terapéuticamente eficaces descritas, se puede monitorizar la población de células madre cancerosas para evaluar la eficacia de una terapia, así como para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer o la eficacia de una pauta terapéutica o profilácticamente eficaz. En determinadas realizaciones de las terapias o pautas profilácticamente eficaces y/o terapéuticamente eficaces descritas, las terapias o pautas dan como resultado una estabilización o reducción de la población de células madre cancerosas en el paciente. En una realización, se monitoriza al sujeto que se está sometiendo a la pauta para evaluar si la pauta ha dado como resultado una estabilización o reducción de la población de células madre cancerosas en el sujeto.

En algunas realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en un sujeto se determina utilizando una técnica bien conocida para un experto en la materia o descrita en la Sección 5.7, más adelante.

Las células madre cancerosas comprenden una subpoblación singular (a menudo 0,1-10 %, más o menos) de un tumor que, al contrario que el 90 % restante, más o menos, del tumor (es decir, la masa tumoral), es relativamente más tumorigénica y de crecimiento relativamente más lento o latente. Dado que las terapias y pautas convencionales han sido diseñadas, en gran parte, para atacar a células que proliferan rápidamente (es decir, las células cancerosas que componen la masa tumoral), las células madre cancerosas que crecen más lentamente pueden ser relativamente más resistentes que la masa tumoral que crece más rápido a terapias y pautas convencionales. Esto explicaría otro motivo para el fracaso de las pautas de tratamiento oncológicas estándar a la hora de garantizar el beneficio a largo plazo en la mayoría de los pacientes con cánceres en estadio avanzado. En una realización específica, una célula o células madre cancerosas es la célula fundadora de un tumor (es decir, es la progenitora de células cancerosas). En algunas realizaciones, una célula o células madre cancerosas tiene una, dos, tres o más, o todas las características o propiedades siguientes: (i) puede albergar la capacidad de iniciar un tumor y/o perpetuar el crecimiento del tumor, (ii) generalmente, puede estar relativamente menos mutada que la masa de un tumor (por ejemplo, debido al crecimiento más lento y, por tanto, menos errores dependientes de la replicación de ADN, reparación de ADN mejorada, y/o cambios epigenéticos/no mutagénicos que contribuyen a su malignidad), (iii) puede tener muchas características de una célula o células madre normales (por ejemplo, un antígeno de superficie de las células y/o perfil de expresión intracelular similares, programas de autorrenovación, resistencia a múltiples fármacos, un fenotipo inmaduro, etc., característicos de células madre normales) y puede derivar de una célula o células madre normales, (iv) puede ser potencialmente sensible a su microentorno (por ejemplo, las células madre cancerosas pueden ser capaces de ser inducidas para diferenciarse y/o dividirse asimétricamente), (v) puede ser la fuente de metástasis, (vi) puede ser de crecimiento lento o latente, (vii) puede dividirse simétricamente, (viii) puede ser tumorigénica (por ejemplo, como se determina mediante experimentos de implantación en NOD/SCID), (ix) puede ser relativamente resistente a terapias tradicionales (es decir, quimiorresistente), y (x) puede comprender una subpoblación de un tumor (por ejemplo, con respecto a la masa tumoral).

En otras realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra procedente de un sujeto se determina/evalúa utilizando una técnica descrita en la presente memoria o bien conocida para un experto en la materia. Dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas y muestras derivadas de una muestra biológica. En determinadas realizaciones, además de la muestra biológica en sí, o además del material derivado de la muestra biológica, tal como células, la muestra utilizada en los métodos comprende agua, sales, glicerina, glucosa, un agente antimicrobiano, parafina, un agente estabilizante químico, heparina, un anticoagulante, o un agente de tamponamiento añadidos. En determinadas realizaciones, la muestra biológica es sangre, suero, orina, médula ósea o líquido intersticial. En otra realización, la muestra es una muestra de tejido. En una realización particular, la muestra de tejido es tejido de mama, cerebro, piel, colon, pulmón, hígado, ovario, páncreas, próstata, riñón, hueso o piel. En una realización específica, la muestra de tejido es una biopsia de tejido normal o tumoral. La cantidad de muestra biológica tomada del sujeto variará según el tipo de muestra biológica y el método de detección que se vaya a emplear. En una realización particular, la muestra biológica es sangre, suero, orina o médula ósea, y la cantidad de sangre, suero, orina o médula ósea tomada del sujeto es 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 8 ml, 10 ml o más. En otra realización, la muestra biológica es un tejido y la cantidad de tejido tomada del sujeto es menos de 10 miligramos, menos de 25 miligramos, menos de 50 miligramos, menos de 1 gramo, menos de 5 gramos, menos de 10 gramos, menos de 50 gramos, o menos de 100 gramos.

De conformidad con los métodos descritos, una muestra derivada de una muestra biológica es una en la que la muestra biológica ha sido sometida a una o más etapas de pretratamiento antes de la detección y/o medición de la población de células madre cancerosas en la muestra. En determinadas realizaciones, se pretrata un fluido biológico mediante centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o mediante una combinación de dichas etapas de

pretratamiento. En otras realizaciones, se pretrata una muestra de tejido mediante congelación, fijación química, inclusión en parafina, deshidratación, permeabilización u homogeneización, seguidas de centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o mediante una combinación de dichas etapas de pretratamiento. En determinadas realizaciones, la muestra se pretrata eliminando células distintas de las células madre o células madre cancerosas de la muestra, o eliminando residuos de la muestra antes de la determinación de la cantidad de células madre cancerosas en la muestra según los métodos descritos.

Las muestras para utilización en los métodos descritos pueden tomarse de cualquier sujeto animal, preferiblemente mamífero, de la forma más preferible humano. El sujeto del que se obtiene y utiliza una muestra de conformidad con los métodos incluye, sin limitación, un sujeto asintomático, un sujeto que manifiesta o presenta 1, 2, 3, 4 o más síntomas de cáncer, un sujeto diagnosticado clínicamente de cáncer, un sujeto predispuesto al cáncer, un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, un sujeto que se está sometiendo a terapia para el cáncer, un sujeto que se ha determinado médicamente que está exento de cáncer (por ejemplo, después de la terapia para el cáncer), un sujeto que está controlando el cáncer, o un sujeto que no ha sido diagnosticado de cáncer. En determinadas realizaciones, el término “no tiene cáncer detectable”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un sujeto o sujetos en los que no es detectable ningún cáncer utilizando un método convencional descrito en la presente memoria (por ejemplo, IRM) o conocido para un experto en la materia. En otras realizaciones, el término se refiere a un sujeto o sujetos exentos de cualquier trastorno.

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

En determinadas realizaciones, una muestra de control positivo o negativo es una muestra que se obtiene o deriva de un tejido o fluido biológico correspondientes como la muestra que se va a analizar de conformidad con los métodos descritos. Esta muestra puede provenir del mismo paciente o de diferentes personas, y en el mismo o diferentes momentos.

Por motivos de claridad de la presente divulgación, y no a modo de limitación, lo siguiente atañe al análisis de una muestra de sangre de un paciente. Sin embargo, como apreciará un experto en la materia, los ensayos y técnicas descritos en la presente memoria se pueden aplicar a otros tipos de muestras de pacientes, que incluyen un fluido corporal (por ejemplo, sangre, médula ósea, plasma, orina, bilis, líquido ascítico), un muestra de tejido que se sospecha que contiene material derivado de un cáncer (por ejemplo, una biopsia) o un homogeneizado de las mismas. La cantidad de muestra que se va a recoger variará con el tipo particular de muestra y método para determinar la cantidad de células madre cancerosas utilizados, y será una cantidad suficiente para detectar las células madre cancerosas en la muestra.

Se puede obtener una muestra de sangre de un paciente que tiene diferentes estadios de desarrollo o enfermedad. Se puede extraer sangre de un sujeto de cualquier parte del cuerpo (por ejemplo, un dedo, una mano, una muñeca, un brazo, una pierna, un pie, un tobillo, un estómago y un cuello) utilizando técnicas conocidas para un experto en la materia, en particular métodos de flebotomía conocidos en la técnica. En una realización específica, se obtiene sangre venosa de un sujeto y se utiliza de conformidad con los métodos descritos. En otra realización, se obtiene sangre arterial y se utiliza de conformidad con los métodos descritos. La composición de la sangre venosa varía según las necesidades metabólicas del área del cuerpo a la que sirve. Por el contrario, la composición de la sangre arterial es uniforme en todo el cuerpo. Para las pruebas de sangre rutinarias, generalmente se utiliza sangre venosa.

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

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

En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de sangre, una muestra de médula ósea o una muestra de biopsia tisular/tumoral, en donde se cuantifica la cantidad de células madre cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo unitario en el caso de un análisis histológico). En determinadas realizaciones, la población de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en la muestra de sangre, médula ósea o biopsia tisular/tumoral, o como un subconjunto de las células cancerosas presentes en la muestra de sangre, médula ósea o biopsia

tisular/tumoral. En otras realizaciones, la población de células madre cancerosas se puede determinar como una porción (por ejemplo, porcentaje) de las células totales. En todavía otras realizaciones, la población de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células madre totales presentes en la muestra de sangre.

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

La cantidad de células madre cancerosas en una muestra de prueba se puede comparar con la cantidad de células madre cancerosas en una muestra o muestras de referencia para evaluar la eficacia de la pauta. En una realización, la muestra de referencia es una muestra obtenida del sujeto que se está sometiendo a terapia en un momento anterior (por ejemplo, antes de recibir la pauta, como muestra de referencia basal, o en un momento anterior mientras está recibiendo la terapia). En esta realización, de forma deseable, la terapia da como resultado una disminución de la cantidad de células madre cancerosas en la muestra de prueba, en comparación con la muestra de referencia. En otra realización, la muestra de referencia se obtiene de un sujeto sano, un sujeto que no tiene cáncer detectable, o de un paciente que está en remisión para el mismo tipo de cáncer. En esta realización, de forma deseable, la terapia da como resultado que la muestra de prueba tenga una cantidad igual de células madre cancerosas, o menor que la cantidad de células madre cancerosas que se detectan en la muestra de referencia.

En otras realizaciones, la población de células madre cancerosas en una muestra de prueba se puede comparar con un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad previamente detectada de células madre cancerosas determinada para el sujeto, para calibrar la respuesta del sujeto a las pautas descritas en la presente memoria. En una realización específica, una estabilización o reducción de la cantidad de células madre cancerosas con respecto a un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad de células madre cancerosas anterior (previamente detectada) determinada para el sujeto indica una mejora en el pronóstico del sujeto o una respuesta positiva a la pauta, mientras que un aumento con respecto al intervalo de referencia predeterminado y/o a la cantidad anterior de células madre cancerosas indica el mismo o peor pronóstico, y/o un fracaso a la hora de responder a la pauta. La cantidad de células madre cancerosas se puede utilizar junto con otras medidas para evaluar el pronóstico del sujeto y/o la eficacia de la pauta. En una realización específica, el intervalo de referencia predeterminado está basado en la cantidad de células madre cancerosas obtenidas de un paciente o una población o poblaciones de pacientes que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente que se está sometiendo a la terapia.

Generalmente, dado que los antígenos de células madre pueden estar presentes tanto en células madre cancerosas como en células madre normales, una muestra del paciente afectado de cáncer tendrá un recuento de células madre mayor que una muestra de un sujeto sano sin cáncer detectable, debido a la presencia de las células madre cancerosas. De forma deseable, la terapia dará como resultado un recuento de células madre cancerosas para la muestra de prueba (por ejemplo, la muestra del paciente que se está sometiendo a terapia) que disminuye y se acerca cada vez más al recuento de células madre en una muestra de referencia, que es una muestra de un sujeto sano sin cáncer detectable, mediante un método convencional.

Si se determina que la reducción de la cantidad de células madre cancerosas es inadecuada, tras comparar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra del sujeto que se está sometiendo a la pauta con la muestra de referencia, el facultativo médico tiene varias opciones posibles para ajustar la pauta. Por ejemplo, el facultativo médico puede aumentar a continuación la posología o intensidad de la terapia administrada, la frecuencia de administración, la duración de la administración, combinar la terapia con otra u otras terapias, cambiar el protocolo terapéutico por completo, lo que incluye detener la terapia, o cualquier combinación de los mismos.

En determinadas realizaciones, la posología, frecuencia y/o duración de la administración de una terapia se modifica como resultado del cambio en la cantidad de células madre cancerosas detectadas en el paciente tratado o del mismo. Por ejemplo, si un sujeto que está recibiendo terapia para la leucemia tiene una medición de células madre cancerosas de 2,5 % de su tumor antes de la terapia y 5 % después de 6 semanas de terapia, se puede modificar o detener la terapia o pauta, dado que el aumento del porcentaje de células madre cancerosas indica que la terapia o pauta no es óptima. Alternativamente, si otro sujeto con leucemia tiene una medición de células madre cancerosas de 2,5 % de su tumor antes de la terapia y 1 % después de 6 semanas de terapia, se puede continuar la terapia o pauta, dado que la disminución del porcentaje de células madre cancerosas indica que la terapia o pauta es eficaz.

Se puede monitorizar/evaluar la cantidad de células madre cancerosas utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia. Las células madre cancerosas se pueden monitorizar, 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

se puede expresar como porcentajes de, por ejemplo, células globales o células cancerosas globales) se puede evaluar detectando la expresión de antígenos sobre células madre cancerosas. Se pueden utilizar técnicas conocidas para los expertos en la materia para medir estas actividades. La expresión de antígenos se puede ensayar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, que incluyen, pero no se limitan a, inmunoelectrotransferencias, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos de tipo “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunofluorescencia, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo y análisis por FACS. En dichas circunstancias, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra de prueba de un sujeto se puede determinar comparando los resultados con la cantidad de células madre en una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de un sujeto que no tiene cáncer detectable) o con un intervalo de referencia predeterminado, o con el propio paciente en un momento anterior (por ejemplo, antes de la terapia o durante la misma).

En una realización específica, la población de células madre cancerosas en una muestra de un paciente se determina mediante citometría de flujo. Este método explota la expresión diferencial de determinados marcadores de superficie sobre células madre cancerosas con respecto a la masa del tumor. Se pueden utilizar anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes) para que reaccionen con las células de la muestra y, posteriormente, clasificar las células mediante métodos de FACS. En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de marcadores de superficie de las células con el fin de determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Por ejemplo, se puede utilizar la clasificación de células tanto positivas como negativas para evaluar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Las células madre cancerosas para tipos de tumores específicos se pueden determinar evaluando la expresión de marcadores sobre células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, los tumores albergan células madre cancerosas y sus marcadores asociados, como se exponen en la Tabla 2 a continuación, que proporciona una lista no limitante de fenotipos de células madre cancerosas asociados a diversos tipos de cáncer.

Tabla 2

Fenotipo de células madre cancerosas	
Tumor	
Leucemia (LMA)	CD34+/CD38–
Mama	CD44+/CD24–
Cerebro	CD133+
Leucemia (LLA)	CD34+/CD10–/CD19–
Ovario	CD44+/CD24–
Mieloma múltiple	CD138–/CD34–/CD19+
Leucemia mielógena aguda	CD34+/CD38–
Melanoma	CD20+
Ependimoma	CD133+/RC2+
Próstata	CD44+/α ₂ β ₁ ^{hi} /CD133+

Los marcadores de células madre cancerosas adicionales incluyen, pero no se limitan a CD123, CLL-1, combinaciones de SLAM (receptores de la familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización; véase Yilmaz *et al.*, “SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity”, Hematopoiesis 107: 924-930 (2006)), tales como CD150, CD244 y CD48, y los marcadores dados a conocer en la patente de EE. UU. n.º 6,004,528 a Bergstein, la solicitud de patente de EE. UU. n.º 09/468,286 en tramitación, y en las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/0036804.

Véase, por ejemplo, la Tabla 1 de la patente de EE. UU. n.º 6,004,528 y las Tablas 1, 2 y 3 de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 09/468,286, y las publicaciones de patente de EE. UU. n.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/0036804.

En una realización específica, la población de células madre cancerosas en una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido, tal como una biopsia de tumor sólido, se determina utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Este método explota la expresión diferencial de determinados marcadores de superficie sobre células madre cancerosas con respecto a la masa del tumor. Se pueden utilizar anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes) para que reaccionen con las células de la muestra y, posteriormente, tefir el tejido. En algunas realizaciones, se utiliza una combinación de determinados marcadores de superficie de las células con el fin de determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Las células madre cancerosas para tipos de tumores específicos se pueden determinar evaluando la expresión de determinados marcadores que son específicos para células madre cancerosas.

En determinadas realizaciones, los tumores albergan células madre cancerosas y sus marcadores asociados, como se exponen en la Tabla 2 anterior.

Se pueden identificar antígenos de células madre cancerosas adecuados: (i) mediante información disponible al público, tal como perfiles de expresión publicados y no publicados, que incluyen antígenos de superficie de células madre cancerosas de un tipo de tumor particular o células madre adultas para un tipo de tejido particular (por ejemplo, Tabla 2), y/o (ii) clonando células madre cancerosas o células madre adultas de un tumor o tipo de tejido particulares, respectivamente, con el fin de determinar sus perfiles de expresión y el complemento de antígenos de superficie las células. La clonación de células madre normales es una técnica empleada rutinariamente en la técnica (Uchida *et al.*, “Heterogeneity of hematopoietic stem Cells”, Curr. Opin. Immunol. 5:177-184 (1993)). De hecho, esta misma técnica se utiliza para identificar células madre normales y células madre cancerosas. Además, la suposición de que una proporción de productos genéticos de células madre normales, por ejemplo, antígenos de superficie de las células, también estarán presentes sobre células madre cancerosas derivadas del mismo tipo de tejido ha demostrado ser una forma eficaz de identificar productos genéticos de células madre cancerosas y células madre cancerosas. Por ejemplo, el conocimiento de que la célula madre hematopoyética normal era CD34+/CD38– dio como resultado la determinación de que las células madre de leucemia mieloide aguda (LMA) son CD34+/CD38– de forma similar. De hecho, esto se confirmó mediante técnicas de clonación de células madre estándar (véase Bonnet *et al.*, “Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell”, Nat. Med. 3:730-737 (1997)). De forma similar, se aislaron células madre cancerosas cerebrales utilizando un marcador de células madre (cerebrales) normales, en este caso CD133 (véase Singh *et al.*, “Identification of human brain tumor initiating Cells”, Nature 432 (7015): 396-401 (2004)).

En determinadas realizaciones que utilizan citometría de flujo de una muestra, se puede utilizar el protocolo de colorantes de Hoechst para identificar células madre cancerosas en tumores. Brevemente, se incuban dos colorantes de Hoechst de diferentes colores (habitualmente rojo y azul) con células tumorales. Las células madre cancerosas, en comparación con las células cancerosas de la masa, sobreexpresan bombas de eflujo de colorante sobre su superficie que permiten que estas células bombeen de nuevo el colorante fuera de la célula. Las células tumorales de la masa tienen en gran medida menos de estas bombas y, por lo tanto, son relativamente positivas para el colorante, que se puede detectar mediante citometría de flujo. Habitualmente, cuando se observa toda la población de células, surge un gradiente de células positivas para el colorante (“colorante⁺⁺⁺”) frente a células negativas para el colorante (“colorante[–]”). Las células madre cancerosas están contenidas en la población de colorante[–] o colorante bajo (colorante^{bajo}). Para consultar un ejemplo de la utilización del protocolo de colorantes de Hoechst para caracterizar una población de células madre, véase Goodell *et al.*, “A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux bomba Capacity in aguamyeloid leukemia”, Blood, 98(4):1166-1173 (2001) y Kondo *et al.*, “Persistence of a small poblation of cancer stem-like cell line in the C6 glioma cell line”, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:781-786 (2004). De esta manera, se podría utilizar citometría de flujo 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 generado por una terapia o pauta determinada.

En otras realizaciones que utilizan citometría de flujo de una muestra, las células de la muestra se pueden tratar con un sustrato para aldehído deshidrogenasa que se vuelve fluorescente cuando es catalizado por esta enzima. Por ejemplo, la muestra se puede tratar con BODIPY®, aminoacetaldehído que es comercializado por StemCell Technologies Inc. como Aldefluor®. Las células madre cancerosas expresan niveles altos de aldehído deshidrogenasa con respecto a las células cancerosas de la masa y, por lo tanto, se vuelven intensamente fluorescentes tras la reacción con el sustrato. Las células madre cancerosas, que se vuelven fluorescentes en este tipo de experimento, se pueden detectar y contar a continuación utilizando un citómetro de flujo estándar. De esta manera, se podría utilizar citometría de flujo 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 generado por una terapia o pauta determinada.

En otras realizaciones, se cultiva una muestra (por ejemplo, una muestra de tumor o tejido normal, muestra de sangre o muestra de médula ósea) obtenida del paciente en sistemas *in vitro* para evaluar la población de células madre cancerosas. Por ejemplo, las muestras de tumores se pueden cultivar sobre 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 puedan contar visualmente. La formación de colonias se considera una medida sustituta del contenido de células madre y, por tanto, se puede utilizar para cuantificar la cantidad de células madre cancerosas. Por ejemplo, con cánceres hematológicos, los ensayos de formación de colonias incluyen ensayos de células formadoras de colonias (CFC), ensayos de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC), y ensayos de células iniciadoras de cultivos en suspensión (SC-IC). De esta manera, se podría utilizar el ensayo de formación de colonias o uno relacionado, tal como la perpetuación/paso a largo plazo de una línea celular, 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. generado por una terapia o pauta determinada.

En otras realizaciones, se mide la formación de esferas para determinar la cantidad de células madre cancerosas en una muestra (por ejemplo, las células madre cancerosas forman agrupaciones tridimensionales de células, denominadas esferas) en medios apropiados que sean propicios para formar esferas. Las esferas se pueden cuantificar para proporcionar una medida de células madre cancerosas. Véase Singh *et al.*, “Identification of a Cancer

Stem Cell from Human Brain Tumors”, Cancer Res. 63: 5821-5828 (2003). También se pueden medir esferas secundarias. Las esferas secundarias se generan cuando las esferas que se forman a partir de la muestra del paciente se rompen y, a continuación, se les permite que se vuelvan a formar. De esta manera, se podría utilizar el ensayo de formación de esferas 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 generado por una terapia o pauta determinada.

En otras realizaciones, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra se puede determinar con un ensayo de empedrado. Las células madre cancerosas de determinados cánceres hematológicos forman “áreas de empedrado” (CA) cuando se añaden a un cultivo que contiene una monocapa de células estromales de médula ósea. Por ejemplo, la cantidad de células madre cancerosas de una muestra de leucemia se puede evaluar mediante esta técnica. Las muestras de tumor se añaden a la monocapa de células estromales de médula ósea. Las células madre cancerosas de leucemia, más que las células de leucemia de la masa, tienen la capacidad de migrar bajo la capa estromal y sembrar la formación de una colonia de células que se pueden observar visualmente mediante microscopía de contraste de fases en aproximadamente 10-14 días como CA. La cantidad de CA en el cultivo es un reflejo del contenido de células madre cancerosas de leucemia en la muestra del tumor, y se considera una medida sustituta de la cantidad de células madre capaces de injertar la médula ósea de ratones inmunodeficientes. Este ensayo también se puede modificar a fin de que las CA se puedan cuantificar utilizando marcas bioquímica de células en proliferación, en lugar de mediante recuento manual, con el fin de aumentar el rendimiento del ensayo. Véase Chung *et al.*, “Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis”, Blood 105(1):77-84 (2005). De esta manera, se podría utilizar el ensayo de empedrado 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 generado a partir de una terapia o pauta determinada.

En otras realizaciones, se analiza una muestra (por ejemplo, una muestra de tumor o tejido normal, muestra de sangre o muestra de médula ósea) obtenida del paciente en sistemas *in vivo* para determinar la población de células madre cancerosas. En determinadas realizaciones, por ejemplo, se utiliza el injerto *in vivo* para cuantificar la cantidad de células madre cancerosas en una muestra. El injerto *in vivo* implica la implantación de un espécimen humano, siendo la lectura la formación de tumores en un animal, tal como en ratones inmunocomprometidos o inmunodeficientes (tales como ratones NOD/SCID). Habitualmente, la muestra del paciente se cultiva o manipula *in vitro* y a continuación se inyecta a los ratones. En estos ensayos, se puede inyectar a los ratones una cantidad decreciente de células de muestras de pacientes, y se puede representar gráficamente la frecuencia de formación de tumores frente a la cantidad de células inyectadas para determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Alternativamente, se puede medir la velocidad de crecimiento del tumor resultante, indicando los tumores más grandes o que avanzan más rápidamente una cantidad de células madre cancerosas mayor en la muestra del paciente. De esta manera, se podría utilizar el modelo/ensayo de injerto *in vivo* 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 generado a partir de una terapia o pauta determinada.

La cantidad de células madre cancerosas en un espécimen se puede comparar con un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad de células madre cancerosas anterior determinada previamente para el sujeto (ya sea antes de la terapia o durante la misma) con el fin de medir la respuesta del sujeto a las pautas de tratamiento descritas en la presente memoria. En una realización específica, una estabilización o reducción de la cantidad de células madre cancerosas con respecto a un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad de células madre cancerosas anterior determinada previamente para el sujeto (ya sea antes de la terapia o durante la misma) indica que la terapia o pauta ha sido eficaz y, por tanto, posiblemente una mejora en el pronóstico del sujeto, mientras que un aumento con respecto al intervalo de referencia predeterminado y/o la cantidad de células madre cancerosas detectada en un momento anterior indica que la terapia o pauta ha sido ineficaz y, por lo tanto, posiblemente el mismo pronóstico del sujeto o un empeoramiento del mismo. La cantidad de células madre cancerosas se puede utilizar con otras medidas estándar del cáncer para evaluar el pronóstico del sujeto y/o la eficacia de la terapia o pauta: tal como la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, la supervivencia sin recidiva, la supervivencia sin enfermedad, la supervivencia sin progresión y la supervivencia general. En determinadas realizaciones, la posología, frecuencia y/o duración de la administración de una terapia se modifica como resultado de la determinación de la cantidad de células madre cancerosas en diversos momentos, que pueden incluir antes de, durante, y/o después de la terapia.

La presente divulgación también se refiere a métodos para determinar que una terapia o pauta contra el cáncer es eficaz a la hora de dirigirse a células madre cancerosas y/o alterarlas en virtud de la monitorización de las células madre cancerosas a lo largo del tiempo, y detectar una estabilización o disminución de la cantidad de células madre cancerosas durante el ciclo de la terapia o pauta contra el cáncer y/o después del mismo.

En un determinado aspecto, se puede describir o comercializar una terapia o pauta como una terapia o pauta con células madre contra el cáncer basándose en la determinación de que una terapia o pauta es eficaz a la hora de dirigirse a células madre cancerosas y/o alterarlas en virtud de haber monitorizado o detectado una estabilización o disminución de la cantidad de células madre cancerosas durante la terapia.

5.5 Métodos para monitorizar células cancerosas

Como parte de las pautas profiláctica y/o terapéuticamente eficaces descritas, la cantidad de células cancerosas (solas o en combinación con la cantidad de células madre cancerosas) se puede monitorizar/evaluar utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia. En determinadas realizaciones de las pautas profiláctica y/o terapéuticamente eficaces descritas, las pautas dan como resultado una estabilización o reducción de la cantidad (expresada, por ejemplo, como un porcentaje) de células cancerosas en el sujeto. En una realización, se monitoriza al sujeto que se está sometiendo a la pauta para determinar si la pauta ha dado como resultado una estabilización o reducción de la cantidad (expresada, por ejemplo, como un porcentaje) de células cancerosas en el sujeto.

En algunas realizaciones, se evalúa la cantidad de células cancerosas en un sujeto utilizando técnicas descritas en la presente memoria o conocidas para un experto en la materia. En otras realizaciones, se detecta la cantidad de células cancerosas en una muestra. Dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas y muestras derivadas de una muestra biológica. En determinadas realizaciones, además de la muestra biológica en sí, o además del material derivado de la muestra biológica, tal como células, la muestra utilizada en los métodos comprende agua, sales, glicerina, glucosa, un agente antimicrobiano, parafina, un agente estabilizante químico, heparina, un anticoagulante, o un agente de tamponamiento añadidos. En determinadas realizaciones, la muestra biológica es sangre, suero, orina, médula ósea o líquido intersticial. En otra realización, la muestra es una muestra de tejido. En una realización particular, la muestra de tejido es tejido de mama, colon, pulmón, hígado, ovario, páncreas, próstata, riñón, hueso o piel. En una realización específica, la muestra de tejido es una biopsia, lo que incluye una biopsia tumoral. La cantidad de muestra biológica tomada del sujeto variará según el tipo de muestra biológica y el método de detección que se vaya a emplear. En una realización particular, la muestra biológica es sangre, suero u orina, y la cantidad de sangre, suero u orina tomada del sujeto es 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml o más. En otra realización, la muestra biológica es un tejido y la cantidad de tejido tomada del sujeto es menos de 10 miligramos, menos de 25 miligramos, menos de 50 miligramos, menos de 1 gramo, menos de 5 gramos, menos de 10 gramos, menos de 50 gramos, o menos de 100 gramos.

De conformidad con los métodos descritos, una muestra derivada de una muestra biológica es una en la que la muestra biológica ha sido sometida a una o más etapas de pretratamiento antes de la detección y/o medición de la población de células cancerosas en la muestra. En determinadas realizaciones, se pretrata un fluido biológico mediante centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o mediante una combinación de dichas etapas de pretratamiento. En otras realizaciones, se pretrata una muestra de tejido mediante congelación, fijación química, inclusión en parafina, deshidratación, permeabilización u homogeneización, seguidas de centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o mediante una combinación de dichas etapas de pretratamiento. En determinadas realizaciones, la muestra se pretrata eliminando células distintas de las células cancerosas de la muestra, o eliminando residuos de la muestra antes de la determinación de la cantidad de células cancerosas en la muestra según los métodos de la presente invención.

Las muestras para utilización en los métodos descritos se pueden tomar de cualquier sujeto animal, preferiblemente mamífero, de la forma más preferible humano. El sujeto del que se obtiene y utiliza una muestra de conformidad con los métodos descritos incluye, sin limitación, un sujeto asintomático, un sujeto que manifiesta o presenta 1, 2, 3, 4 o más síntomas de cáncer, un sujeto diagnosticado clínicamente de cáncer, un sujeto predispuesto al cáncer, un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, un sujeto que se está sometiendo a terapia para el cáncer, un sujeto que se ha determinado médicamente que está exento de cáncer (por ejemplo, después de la terapia para el cáncer), un sujeto que está controlando el cáncer, o un sujeto que no ha sido diagnosticado de cáncer.

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

La cantidad de células cancerosas en una muestra se puede expresar como el porcentaje de, por ejemplo, células globales en la muestra. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre o una muestra de médula ósea, en donde se cuantifica la cantidad de células cancerosas por unidad de volumen (por ejemplo, 1 ml) u otra unidad medida (por ejemplo, por campo unitario en el caso de un análisis histológico). En determinadas realizaciones, la población de células cancerosas se puede determinar como un porcentaje de las células sanguíneas totales.

En otras realizaciones, la muestra del paciente es una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia de un sujeto con tejido canceroso o que se sospecha que lo tiene), donde la cantidad de células cancerosas se puede medir, por ejemplo, mediante inmunohistoquímica o sobre la base de la cantidad de células cancerosas por unidad de peso del tejido.

La cantidad de células cancerosas en la muestra de prueba se puede comparar con la cantidad de células cancerosas medida en una muestra o muestras de referencia para evaluar la eficacia de la pauta. En una realización, la muestra de referencia es una muestra del sujeto que se está sometiendo a terapia, en un momento anterior (por ejemplo, antes de recibir la pauta, como muestra de referencia basal, o en un momento anterior mientras está recibiendo la terapia).

En esta realización, de forma deseable, la terapia da como resultado una disminución de la cantidad de células cancerosas en la muestra de prueba, en comparación con la muestra de referencia. En otra realización, la muestra de referencia se obtiene de un sujeto sano sin cáncer detectable, o de un paciente que está en remisión para el mismo tipo de cáncer. En esta realización, de forma deseable, la terapia da como resultado que la muestra de prueba tenga una cantidad igual de células cancerosas que la detectada en la muestra de referencia (por ejemplo, sin células cancerosas detectables).

Si la reducción de la cantidad de células cancerosas se considera demasiado pequeña, el facultativo médico tiene varias opciones para ajustar la pauta. Por ejemplo, el facultativo médico puede aumentar a continuación la posología de la terapia administrada, la frecuencia de administración, la duración de la administración, combinar la terapia con otra u otras terapias, detener la terapia, o cualquier combinación de los mismos.

La cantidad de células madre cancerosas se puede monitorizar/evaluar utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia. Las células cancerosas se pueden monitorizar, por ejemplo, obteniendo una muestra, tal como una muestra de tumor, una muestra de sangre o una muestra de médula ósea, de un sujeto y detectando células cancerosas en la muestra. La cantidad de células cancerosas en una muestra (que se puede expresar como un porcentaje) se puede evaluar detectando la expresión de antígenos sobre células cancerosas y/o detectando la proliferación de células cancerosas. Se pueden utilizar técnicas conocidas para los expertos en la materia para medir estas actividades. Por ejemplo, la proliferación celular se puede ensayar mediante ensayos de incorporación de ³H-timidina y recuentos de células con azul de tripano. La expresión de antígenos se puede ensayar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, que incluyen, pero no se limitan a, inmunoelectrotransferencias, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática), inmunoensayos de tipo “sándwich”, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo, análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), e inmunofluorescencia.

La cantidad de células cancerosas se puede comparar con un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad anterior de células cancerosas determinada para el sujeto para calibrar la respuesta del sujeto a las pautas descritas en la presente memoria. En una realización específica, una reducción de la cantidad de células madre cancerosas con respecto a un intervalo de referencia predeterminado y/o una cantidad de células cancerosas anterior determinada para el sujeto indica una mejora en el pronóstico del sujeto o respuesta a una terapia, mientras que un aumento con respecto al intervalo de referencia predeterminado y/o a la cantidad de células cancerosas anterior indica el mismo o peor pronóstico, o fracaso a la hora de responder a una terapia. En determinadas realizaciones, la posología, frecuencia y/o duración de la administración de una terapia se modifica como resultado del cambio en la cantidad de células cancerosas.

En algunas realizaciones, la población de células cancerosas se puede monitorizar/evaluar utilizando mediciones generales de la población de células cancerosas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la población de células cancerosas se determina utilizando métodos de adquisición de imágenes, tales como tomografía computarizada (TC), adquisición de imágenes de resonancia magnética (IRM), ecografía, imágenes de rayos X, mamografía, adquisición de imágenes con radionúclidos, TEP o gammagrafías óseas.

En realizaciones que comprenden el tratamiento de tumores sólidos, el tamaño aparente del tumor puede proporcionar una estimación de la población de células cancerosas. Se pueden utilizar varios métodos conocidos para evaluar el tamaño aparente del tumor. Los ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen métodos de adquisición de imágenes (por ejemplo, tomografía computarizada (TC), adquisición de imágenes de resonancia magnética (IRM), TEP, ecografía, adquisición de imágenes de rayos X, mamografía, gammagrafías óseas e adquisición de imágenes con radioisótopos), métodos visuales (por ejemplo, colonoscopia, broncoscopia, endoscopia), examen físico (por ejemplo, examen de próstata, examen de mamas, examen de ganglios linfáticos, examen abdominal, palpación general), pruebas de sangre (por ejemplo, prueba de antígeno prostático específico (PSA), prueba de antígeno carcinoembrionario (CEA), prueba de antígeno del cáncer (CA)-125, alfafetoproteína (AFP)), análisis de médula ósea (por ejemplo, en casos de neoplasias malignas hematológicas), histopatología, citología y citometría de flujo.

En algunas realizaciones, el tamaño aparente del tumor se puede medir mediante evaluaciones basadas en el tamaño de lesiones tumorales determinadas a partir de métodos de adquisición de imágenes. En realizaciones específicas, las evaluaciones se realizan de conformidad con las directrices de los Criterios de Evaluación de la 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. de Nat. Cane. Inst. 92(3), 205-216 (2000). Por ejemplo, en realizaciones específicas, cuando se utilizan técnicas de adquisición de imágenes convencionales (por ejemplo, TC, IRM o rayos X convencionales), las lesiones en el sujeto que son representativas del tamaño aparente del tumor se seleccionan de modo tal que sean de al menos =20 mm en su diámetro más largo en el momento basal (antes del tratamiento) y, cuando se utiliza TC helicoidal, se deben seleccionar lesiones que sean de al menos =10 mm en su diámetro más largo en el momento basal.

5.6 Métodos para monitorizar el recuento de linfocitos, el recuento de neutrófilos, el recuento de plaquetas y la hemoglobina

Como parte de las pautas profiláctica y/o terapéuticamente eficaces, se pueden monitorizar/evaluar los recuentos de linfocitos de sangre periférica utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia. Los recuentos de linfocitos de sangre periférica en un sujeto se pueden determinar, por ejemplo, obteniendo una muestra de sangre periférica de dicho sujeto, separando los linfocitos de otros componentes de la sangre periférica, tales como plasma, utilizando, por ejemplo, centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia), y contando los linfocitos utilizando azul de tripano. Los recuentos de células T de sangre periférica en un sujeto se pueden determinar, por ejemplo, separando los linfocitos de otros componentes de la sangre periférica, tales como plasma, utilizando, por ejemplo, centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Marcando las células T con un anticuerpo dirigido a un antígeno de células T, tal como CD3, CD4 y CD8, que está conjugado a un agente detectable mediante FACS, tal como FITC o ficoeritrina, y midiendo la cantidad de células T mediante FACS. Además, se puede determinar el efecto sobre un subconjunto particular de células T (por ejemplo, CD2+, CD4+, CD8+, CD45+, CD45RO+, CD45RA+, o CD8+RA+) o células NK utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia, tales como FACS.

El recuento de neutrófilos absoluto (ANC) del sujeto se puede monitorizar/evaluar utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, la pauta incluye monitorizar el ANC del paciente con el fin de evitar el riesgo de que el paciente desarrolle neutropenia.

El ANC se puede calcular a partir de mediciones del número total de glóbulos blancos (WBC) y de los números de neutrófilos y cayados (neutrófilos inmaduros). El ANC puede ser determinado manualmente por técnicos médicos cualificados o mediante resultados de ANC automatizados obtenidos desde analizadores de hematología automatizados.

El recuento de plaquetas (PLT) del sujeto se puede monitorizar/evaluar utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, la pauta incluye monitorizar el recuento de plaquetas del paciente para evitar el riesgo de que el paciente desarrolle trombocitopenia o pase a ser dependiente de transfusiones de sangre. Se pueden administrar transfusiones como determine el facultativo.

La hemoglobina (Hgb) del sujeto se puede monitorizar/evaluar utilizando técnicas estándar conocidas para un experto en la materia. En algunas realizaciones, la pauta incluye monitorizar la hemoglobina del paciente para evitar el riesgo de que el paciente desarrolle anemia o pase a ser dependiente de transfusiones. Se pueden administrar transfusiones o factores de crecimiento (por ejemplo, eritropoyetina) como determine el facultativo.

5.7 Ensayos biológicos

5.7.1 Ensayos *in vitro*

Los compuestos, composiciones farmacéuticas y pautas descritos se pueden probar *in vitro* y/o *in vivo* para determinar su capacidad para reducir la cantidad de células cancerosas y/o células madre cancerosas, o inhibir su proliferación. La capacidad de un compuesto o una pauta para reducir la cantidad de células cancerosas, células madre cancerosas y/o células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos) o inhibir su proliferación se puede evaluar: detectando la expresión de antígenos sobre células cancerosas, células madre cancerosas y/o células inmunitarias; detectando la proliferación o viabilidad de células cancerosas, células madre cancerosas y células inmunitarias; detectando la función efectora de células cancerosas y células madre cancerosas. Se pueden utilizar técnicas conocidas para los expertos en la materia para medir estas actividades. Por ejemplo, la proliferación celular se puede ensayar mediante ensayos de incorporación de ³H-timidina y recuentos de células con azul de tripano. La expresión de antígenos se puede ensayar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como inmunoelctrotransferencias, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y análisis mediante FACS.

Un compuesto, composición farmacéutica o pauta se prueba preferiblemente *in vitro* y a continuación *in vivo* para determinar la actividad terapéutica o profiláctica deseada antes de la utilización en humanos. Por ejemplo, los ensayos que se pueden utilizar para determinar si la administración de un compuesto específico está indicada incluyen ensayos de cultivos celulares en los que se hace crecer una muestra de tejido del paciente (por ejemplo, una célula cancerosa o una célula madre cancerosa) en cultivo y se expone a un compuesto de la presente invención, o se pone en contacto de otro modo con el mismo, y se observa el efecto de dicho compuesto sobre la muestra de tejido. La muestra de tejido se puede obtener mediante biopsia del paciente. Esta prueba permite la identificación de la terapia más terapéuticamente eficaz (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) para cada paciente individual.

Determinación de la viabilidad celular utilizando el ensayo XTT: en algunos casos, se aíslan células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano utilizando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-CD34. A continuación, se

cuentan las células aisladas y se dividen en alícuotas en placas de 96 pocillos y, a continuación, se incuban en presencia de concentraciones variables de cantaridina o norcantaridina. La viabilidad celular se mide mediante la adición del reactivo colorimétrico XTT. La viabilidad se determina mediante la absorbancia de cultivos tratados a aproximadamente 450-500 nm, en comparación con cultivos no tratados. En otros casos, las células utilizadas en el ensayo pueden ser una línea celular de leucemia, tal como MV4;11. El ensayo también se puede utilizar para determinar el curso temporal de muerte celular por diversos compuestos realizando el ensayo XTT sobre cultivos que se incuban con los compuestos durante periodos de tiempo variables.

Ensayo de empedrado: el ensayo de células formadoras de áreas de empedrado (CAFC) explota un criterio de valoración visual reproducible para la cuantificación de células madre cancerosas. Las muestras de leucemia se añaden a cultivos adherentes de células estromales, en algunas realizaciones, células estromales MS-5. Las células madre cancerosas del cultivo migrarán por debajo de las células estromales MS-5 y formarán una colonia de células denominada empedrado que se puede cuantificar visualmente. Para probar el efecto de la cantaridina o norcantaridina sobre la población de células madre cancerosas utilizando este ensayo, primero se cultivan las células en presencia del fármaco. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante 16 horas. Después de esta incubación, las células se añaden a los cultivos estromales. Una reducción de la formación de áreas de empedrado en cultivos que han sido tratados con el fármaco, en comparación con las células no tratadas, representa actividad de células madre cancerosas para el fármaco.

5.7.2 Ensayos *in vivo*

(no forman parte de la presente invención).

Los compuestos, composiciones farmacéuticas y pautas descritos se pueden probar en sistemas de modelos animales adecuados antes de la utilización en humanos. Dichos sistemas de modelos animales incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Se puede utilizar cualquier sistema animal bien conocido en la técnica. Varios aspectos del procedimiento pueden variar; dichos aspectos incluyen, pero no se limitan a, la pauta temporal de administración de las modalidades terapéuticas (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos), si dichas modalidades terapéuticas se administran independientemente o como una combinación, y la frecuencia de administración de las modalidades terapéuticas.

Se pueden utilizar modelos animales para el cáncer para evaluar la eficacia de un compuesto o una terapia combinada. Los ejemplos de modelos animales para cáncer de pulmón incluyen, pero no se limitan a, modelos animales de cáncer de pulmón descritos por Zhang y Roth (1994, *In Vivo* 8(5):755-69) y un modelo de ratón transgénico con función de p53 alterada (véase, por ejemplo, Morris *et al.*, *J. La. State Med. Soc.* 1998, 150(4):179-85). Un ejemplo de modelo animal para cáncer de mama incluye, pero no se limita, un ratón transgénico que sobreexpresa ciclina D1 (véase, por ejemplo, Hosokawa *et al.*, *Transgenic Res.* 2001, 10(5), 471-8. Un ejemplo de un modelo animal para cáncer de colon incluye, pero no se limita a, un ratón con doble desactivación de TCR b y p53 (véase, por ejemplo, Kado *et al.*, *Cáncer Res.* 2001, 67(6):2395-8). Los ejemplos de modelos animales para cáncer pancreático incluyen, pero no se limitan a, un modelo metastásico de adenocarcinoma pancreático murino PancO2 (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, *Int. J. Pancreatol.* 2001, 29(1):37-46) y tumores pancreáticos subcutáneos generados en ratones nu-nu (véase, por ejemplo, Ghaneh *et al.*, *Gene Ther.* 2001, 8(3):199-208). Los ejemplos de modelos animales para linfoma no hodgkiniano incluyen, pero no se limitan a, un ratón con inmunodeficiencia combinada grave ("SCID") (véase, por ejemplo, Bryant *et al.*, *Lab Invest.* 2000, 80(4), 553-73) y un ratón transgénico IgHmu-HOX11 (véase, por ejemplo, Hough *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95(23), 13853-8. Un ejemplo de un modelo animal para cáncer esofágico incluye, pero no se limita a, un ratón transgénico para el oncogén E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (véase, por ejemplo, Herber *et al.*, *J. Virol.* 1996, 70(3):1873-81). Los ejemplos de modelos animales para carcinomas colorrectales incluyen, pero no se limitan a, modelos de ratón Apc (véase, por ejemplo, Fodde y Smits, *Trends Mol. Med.* 2001, 7(8):369-73 y Kuraguchi *et al.*, *Oncogene* 2000, 19(50), 5755-63).

En determinadas técnicas *in vivo*, se utiliza un agente de adquisición de imágenes, o resto de diagnóstico, que se une a moléculas sobre células cancerosas o células madre cancerosas, por ejemplo, antígenos de superficie de células cancerosas o células madre cancerosas. Por ejemplo, se fija una etiqueta fluorescente, radionúclido, metal pesado o emisor de fotones a un anticuerpo (lo que incluye un fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno de superficie de células madre cancerosas. Los antígenos de superficie de células madre cancerosas se han enumerado anteriormente en la Tabla 2. El facultativo médico puede infundir el anticuerpo marcado al paciente antes de, durante, o después del tratamiento y, a continuación, el facultativo puede colocar al paciente en un escáner/revelador de cuerpo entero que pueda detectar la marca fijada (por ejemplo, etiqueta fluorescente, radionúclido, metal pesado, emisor de fotones). El escáner/revelador (por ejemplo, el escáner de TC, IMR u otro escáner, por ejemplo, detector de marca fluorescente, que pueda detectar la marca) registra la presencia, cantidad/cuantía y ubicación corporal del anticuerpo unido. De esta manera, el mapeo y cuantificación de etiquetas (por ejemplo, fluorescencia, radiactividad, etc.) en patrones (es decir, diferentes de los patrones de células madre normales dentro de un tejido) dentro de un tejido o tejidos indica la eficacia del tratamiento en el cuerpo del paciente, en comparación con un control de referencia, tal como el mismo paciente en un momento anterior o un paciente que no tiene cáncer detectable. Por ejemplo, una señal grande (con respecto a un intervalo de referencia o una fecha de tratamiento anterior, o antes del tratamiento) en una ubicación particular indica la presencia de células madre cancerosas. Si esta señal ha aumentado con respecto a una

fecha anterior, esto sugiere un empeoramiento de la enfermedad y el fracaso de la terapia o pauta. Alternativamente, una disminución de la señal indica que la terapia o pauta ha sido eficaz.

De forma similar, la eficacia de la pauta terapéutica a la hora de reducir la cantidad de células cancerosas en animales (lo que incluye humanos) que se están sometiendo a tratamiento se puede evaluar utilizando técnicas *in vivo*. En una realización, el facultativo médico realiza la técnica de adquisición de imágenes con una molécula marcada que se une específicamente a la superficie de una célula cancerosa, por ejemplo, un antígeno de superficie de células cancerosas. Consulte la Sección 5.4, arriba, que enumera determinados antígenos de superficie de células cancerosas. De esta manera, el mapeo y cuantificación de etiquetas (por ejemplo, fluorescencia, radiactividad) en patrones dentro de un tejido o tejidos indica la eficacia del tratamiento en el cuerpo del paciente que se está sometiendo a tratamiento.

En un aspecto específico, la cantidad de células madre cancerosas se detecta *in vivo* en un sujeto según un método que comprende las etapas de: (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente de unión a marcadores de células madre cancerosas marcado que se une específicamente a un marcador de superficie de las células encontrado sobre 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 sitios del sujeto donde se expresa el marcador de superficie de células madre cancerosas. De conformidad con este aspecto, el agente de unión a marcadores de superficie de células madre cancerosas se administra al sujeto según cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa) o por vía intraperitoneal. De conformidad con este aspecto, la cantidad eficaz del agente es la cantidad que permite la detección del agente en el sujeto. Esta cantidad variará según el sujeto particular, la marca utilizada y el método de detección empleado. Por ejemplo, se entiende en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de adquisición de imágenes utilizado determinarán la cantidad de agente marcado necesaria para detectar el agente en un sujeto utilizando adquisición de imágenes. En el caso de un agente radiomarcado para un sujeto humano, la cantidad de agente marcado administrado se mide en términos de radiactividad, por ejemplo de aproximadamente 5 a 20 milicurios de ⁹⁹Tc. El intervalo de tiempo después de la administración del agente marcado que es suficiente para permitir que el agente marcado se concentre en sitios del sujeto donde se expresa el marcador de superficie de células madre cancerosas variará en función de varios factores, por ejemplo, el tipo de marca utilizada, el modo de administración y la parte del cuerpo del sujeto de la que se adquieren imágenes. En un aspecto particular, el intervalo de tiempo que es suficiente es de 6 a 48 horas, 6 a 24 horas, o 6 a 12 horas. En otro aspecto, el intervalo de tiempo es de 5 a 20 días o 5 a 10 días. La presencia del agente de unión a marcadores de superficie de células madre cancerosas marcado se puede detectar en el sujeto utilizando medios de adquisición de imágenes conocidos en la técnica. En general, los medios de adquisición de imágenes empleados dependen del tipo de marca utilizada. Los expertos en la materia podrán determinar los medios apropiados para detectar una marca particular. Los métodos y dispositivos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (TC), escáner de cuerpo entero, tal como tomografía de emisión de positrones (TEP), adquisición de imágenes de resonancia magnética (IRM), fluorescencia, quimioluminiscencia, un dispositivo de adquisición de imágenes que pueda detectar y ubicar una marca fluorescente, y sonografía. En una realización específica, el agente de unión a marcadores de superficie de células madre cancerosas se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente utilizando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston et al., patente de EE.UU. n.º 5,441,050). En otro aspecto, el agente de unión a marcadores de superficie de células madre cancerosas se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente utilizando un instrumento de barrido sensible a la fluorescencia. En otro aspecto, el agente de unión a marcadores de superficie de células madre cancerosas se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente utilizando tomografía de emisión de positrones. En otro aspecto más, el agente de unión a marcadores de superficie de células madre cancerosas se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente utilizando adquisición de imágenes de resonancia magnética (IRM).

Se pueden utilizar cualesquiera ensayos *in vitro* o *in vivo* (*ex vivo*) conocidos para los expertos en la materia que puedan detectar y/o cuantificar células madre cancerosas para monitorizar células madre cancerosas con el fin de evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de una terapia o pauta contra el cáncer dada a conocer en la presente memoria para el cáncer o uno o más síntomas del mismo; o se pueden utilizar estos ensayos para evaluar el pronóstico de un paciente. Los resultados de estos ensayos se pueden utilizar a continuación para posiblemente mantener o modificar la terapia o pauta contra el cáncer.

5.7.3 Evaluación de la toxicidad

La toxicidad y/o eficacia de compuestos, composiciones farmacéuticas y pautas descritos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para 50 % de la población) y DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren pautas terapéuticas que presenten índices terapéuticos amplios. Aunque se pueden utilizar pautas terapéuticas que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija dichos agentes al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de posología de las terapias para utilización en humanos. La posología de dichos agentes se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} , con poca o ninguna toxicidad para tejidos normales. La posología puede variar dentro de este intervalo en función de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia utilizada en el método, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición semimáxima de los síntomas), como se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con más exactitud dosis útiles en humanos. Los niveles de compuestos en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

5.8 Artículos de fabricación

Se describe un producto farmacéutico envasado y etiquetado acabado. Este artículo de fabricación incluye la forma farmacéutica unitaria apropiada en un recipiente o envase apropiado, tal como un vial de vidrio u otro envase que esté sellado herméticamente. El producto farmacéutico puede contener, por ejemplo, un conjugado de la presente invención en una forma farmacéutica unitaria en un primer envase y, en un segundo envase, agua estéril para inyección. Alternativamente, la forma farmacéutica unitaria puede ser un sólido adecuado para suministro oral, transdérmico, intranasal o tópico.

En un aspecto específico, la forma farmacéutica unitaria es adecuada para suministro parenteral, intravenoso, intramuscular, intranasal, oral, intraperitoneal, tópico o subcutáneo. Por tanto, la presente invención abarca soluciones, preferiblemente estériles, adecuadas para cada vía de suministro.

Como con cualquier producto farmacéutico, el material de embalaje y el envase están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y envío. Además, los productos descritos incluyen instrucciones de utilización u otro material informativo que asesoran al médico, técnico o paciente sobre cómo prevenir o tratar adecuadamente la enfermedad o trastorno en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren una pauta posológica, que incluyen, pero no se limitan a, dosis reales, procedimientos de monitorización, recuentos de células cancerosas, recuentos de células madre cancerosas y otra información de monitorización.

Específicamente, se describe un artículo de fabricación que comprende material de embalaje, tal como una caja, frasco, tubo, vial, envase, pulverizador, insuflador, bolsa intravenosa (i.v.), sobre y similares; y al menos una forma farmacéutica unitaria de un agente farmacéutico contenida dentro de dicho material de embalaje, en donde dicho agente farmacéutico comprende un compuesto de la presente invención, y en donde dicho material de embalaje incluye medios de instrucción que indican que dicho compuesto se puede utilizar para prevenir, controlar, tratar y/o mitigar uno o más síntomas asociados al cáncer, o uno o más síntomas del mismo, administrando dosis específicas y utilizando pautas posológicas específicas, como se describen en la presente memoria.

En un aspecto preferido, el artículo de fabricación incluye anticuerpos marcados que se unen a células cancerosas y, preferiblemente, que se unen a células madre cancerosas. Como tal, el artículo contiene un método para monitorizar la eficacia de la pauta terapéutica y para ajustar, si es necesario, las posologías y/o pautas terapéuticas.

También se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases llenos de reactivos para detectar, monitorizar y/o medir células madre cancerosas. En una realización, el paquete o kit farmacéutico comprende opcionalmente instrucciones para la utilización de los reactivos proporcionados para detectar y/o medir células madre cancerosas. En otra realización, el paquete o kit farmacéutico comprende opcionalmente un aviso, en la forma prescrita por un organismo gubernamental, que regula la fabricación, utilización o venta de productos farmacéuticos o biológicos, el cual refleja la autorización por el organismo de fabricación para utilización o venta para administración humana.

En un aspecto, el paquete o kit farmacéutico comprende, en uno o más envases, un agente de unión a marcadores de superficie de células madre cancerosas. En una realización particular, el agente es un anticuerpo que se une selectiva o específicamente a un marcador de superficie de células madre cancerosas. En una realización particular, el agente es un anticuerpo (lo que incluye, por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab o $F(ab)_2$, o fragmentos de unión a epítopos), que reacciona de forma cruzada con cualquier marcador de superficie de células madre cancerosas. En otro aspecto, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con uno cualquiera de los marcadores de superficie de células madre cancerosas enumerados en la Tabla 2. En otro aspecto, el anticuerpo reacciona con uno cualquiera de los marcadores de superficie de células madre cancerosas enumerados en la Tabla 1 de la patente de EE. UU. n.º 6,004,528 o las Tablas 1, 2 o 3 de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 09/468,286, y las publicaciones de solicitudes de patente de EE. UU. n.º 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/0036804. De conformidad con este aspecto, el paquete o kit farmacéutico comprende uno o más anticuerpos que se unen a marcadores de superficie de células madre cancerosas, en donde cada anticuerpo se une a un epítipo diferente del marcador de superficie de

células madre cancerosas y/o se une al marcador de superficie de células madre cancerosas con una afinidad diferente.

Para kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (que puede estar o no fijado a un soporte sólido) que se une a una proteína marcadora de superficie de células madre cancerosas y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente, que se une a la proteína marcadora de superficie de células madre cancerosas unida por el primer anticuerpo, o al primer anticuerpo, y está conjugado a una marca detectable (por ejemplo, una marca fluorescente, un isótopo radiactivo o una enzima). Los kits a base de anticuerpos también pueden comprender perlas para realizar una inmunoprecipitación. Cada componente de los kits a base de anticuerpos está generalmente se encuentra en su propio envase adecuado. Por tanto, estos kits comprenden generalmente distintos envases adecuados para cada anticuerpo. Además, los kits a base de anticuerpos pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de la realización del ensayo. Como ejemplo, un kit puede incluir un anticuerpo anti-CD34 para selección positiva, un anticuerpo anti-CD38 para selección negativa, y un anticuerpo anti-CD123 para selección positiva para aislar y/o cuantificar y/o ayudar a la determinación de la cantidad de células madre cancerosas de leucemia (que son CD34+/CD38-/CD123+).

Para kits de micromatrices de ácido nucleico, los kits comprenden generalmente (pero no se limitan a) sondas específicas para determinados genes fijados a una superficie de soporte sólida. En otro aspecto, las sondas son solubles. En una de dichas realizaciones, las sondas pueden ser oligonucleótidos o sondas de mayor longitud, que incluyen sondas que varían de 150 nucleótidos de longitud a 800 nucleótidos de longitud. Las sondas se pueden marcar con una marca detectable. Los kits de micromatrices pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de la realización del ensayo. Los kits también pueden comprender reactivos de hibridación y/o reactivos necesarios para detectar una señal producida cuando una sonda se hibrida a una secuencia de ácido nucleico de marcador de superficie de células madre cancerosas. Generalmente, los materiales y reactivos para los kits de micromatrices están en uno o más envases. Cada componente del kit está generalmente en su propio envase adecuado.

Para PCR cuantitativa, los kits comprenden generalmente cebadores preseleccionados específicos para determinadas secuencias de ácido nucleico de marcadores de superficie de células madre cancerosas. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender enzimas adecuadas para amplificar ácidos nucleicos (por ejemplo, polimerasas, tales como Taq), y desoxinucleótidos y tampones necesarios para la mezcla de reacción para amplificación. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender sondas específicas para las secuencias de ácido nucleico asociadas a una afección o indicativas de la misma. Las sondas pueden o no estar marcadas con un fluoróforo. Las sondas pueden o no estar marcadas con una molécula extintora. En algunas realizaciones, los kits de PCR cuantitativa también comprenden componentes adecuados para la transcripción inversa de ARN, que incluyen enzimas (por ejemplo, transcriptasas inversas, tales como AMV, MMLV y similares) y cebadores para la transcripción inversa, junto con desoxinucleótidos y tampones necesarios para la reacción de transcripción inversa. Cada componente del kit de PCR cuantitativa está generalmente en su propio envase adecuado. Por tanto, estos kits comprenden generalmente distintos envases adecuados para cada reactivo, enzima, cebador y sonda individuales. Además, los kits de PCR cuantitativa pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de la realización del ensayo.

Un kit puede comprender además opcionalmente una cantidad predeterminada de un polipéptido marcador de superficie de células madre cancerosas aislado o un ácido nucleico que codifica un marcador de superficie de células madre cancerosas, por ejemplo, para utilización como patrón o control. Los métodos de diagnóstico descritos pueden ayudar a realizar o monitorizar un estudio clínico.

Se pueden utilizar muestras de prueba adecuadas, por ejemplo, de suero o tejido, obtenidas de un sujeto para el diagnóstico.

Basándose en los resultados obtenidos mediante la utilización del paquete o kit farmacéutico (es decir, si la cantidad de células madre cancerosas se ha estabilizado o ha disminuido), el facultativo médico que administra la terapia o pauta contra el cáncer puede decidir continuar la terapia o pauta. Alternativamente, basándose en el resultado de que la cantidad de células madre cancerosas ha aumentado, el facultativo médico puede decidir continuar, modificar o detener la terapia o pauta.

6. Ejemplos

Los ejemplos siguientes son ilustrativos y no deben considerarse como limitantes del alcance de la presente invención. Aquí se pueden hacer aquí variaciones razonables, tales como las que se le ocurren a un experto en la materia razonable, sin apartarse del alcance de la presente invención.

6.1 Ejemplo 1 (ilustrativo)

6.1.1 Pacientes y diseño del estudio

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

Los pacientes fueron diagnosticados de LMA, basándose en una biopsia de médula ósea, y recidiva de la enfermedad o LMA de bajo riesgo (síndrome mielodisplásico (SMD) previo relacionado con el tratamiento, edad del paciente >70 años, o citogenética desfavorable y no candidato para trasplante alogénico). Los pacientes debían tener un estado funcional <2, WBC <10 000/L, bilirrubina <1,5 mg/dL, transaminasas <2,5 veces el límite superior de la normalidad, albúmina >3 g/dL, creatinina <1,5 mg/dL, reserva cardíaca adecuada (EF >40 %), concentración sérica pretratamiento con anti-DT <2,4 pg/ml, estar dispuestos a dar el consentimiento informado y ser tratados en un sitio autorizado, estar dispuestos a utilizar una forma autorizada de control de la natalidad mientras estuvieran en el estudio, no tener problemas médicos graves simultáneos, infecciones no controladas, CID o embarazo, no tener leucemia activa en el SNC, no haber tenido un infarto de miocardio en los últimos seis meses, no necesitar oxígeno, y no tiene alergia a la toxina diftérica.

Los pacientes fueron ingresados en el hospital, recibieron alopurinol, solución salina normal, moxifloxacina, fluconazol, vitamina K, paracetamol, difenhidramina e hidrocortisona y dosis crecientes interpaciente de DT388IL-3 i.v. durante 15 minutos los lunes, miércoles y viernes durante dos semanas. Se trataron cohortes de al menos 3 pacientes con cada nivel de dosis. Los pacientes fueron monitorizados para detectar toxicidades utilizando los Criterios comunes de terminología para acontecimientos adversos (CTCAE) del NCI estadounidense, versión 3.0. Los signos vitales se midieron con frecuencia en los días de tratamiento. Se registraron minuciosamente los datos de entrada/resultados cada día. Se realizaron pruebas de hemograma completo (CBC), panel metabólico completo (CMP), panel de coagulación, lactato deshidrogenasa (LDH), ácido úrico y magnesio cada día. Se extrajo sangre para estudios de farmacología clínica, que incluyeron la farmacocinética y la respuesta inmunitaria. Las biopsias de médula ósea se repitieron en los días 15, 30, 60, y cada tres meses hasta la recidiva. Las respuestas se midieron basándose en las recomendaciones revisadas del grupo de trabajo internacional.

6.1.2 Resultados

Se han cribado cuarenta y nueve pacientes con LMA y se han tratado veintisiete pacientes (Tabla 3). La mediana de edad de los pacientes tratados era 59 años (intervalo, 25-81 años). Había trece varones y catorce mujeres. La enfermedad fue *de novo* en dos, primera recidiva en diez, segunda recidiva en siete, y resistente en ocho pacientes. Tres pacientes tenían antecedentes de SMD, y uno tenía antecedentes de LMA secundaria. Un paciente de cada había recibido previamente un trasplante autólogo o alogénico de células madre. La citogenética era desfavorable en diez, intermedia en dieciséis y no se había realizado en uno. Siete pacientes fueron tratados con 4 µg/kg, ocho pacientes fueron tratados con 5,3 µg/kg, once pacientes tratados con 7,1 µg/kg y un paciente tratado con 9 µg/kg de DT₃₈₈IL-3 (Tabla 4). Las toxicidades relacionadas con el fármaco fueron leves o moderadas, y transitorias, e incluyeron fiebre, escalofríos, hipotensión, hipoxemia e hipoalbuminemia. Entre veintisiete pacientes evaluables, observamos una RC continua de 6 meses o más de duración, dos remisiones parciales (RP) que duraron uno y dos meses o más, y tres respuestas mínimas, con aclaramiento de blastos periféricos y citorreducciones de blastos medulares de 89 %, 90 % y 93 % que duraron de uno a dos meses (Tabla 5 y Figura 4).

Las toxicidades hasta la fecha han sido leves o moderadas en el estudio clínico. Se produjeron fiebres, pero respondieron a paracetamol y métodos de enfriamiento. La hipotensión y la uremia transitoria respondieron a la hidratación. La hipoxemia y la hipoalbuminemia revirtieron con infusiones de albúmina y diuresis. No se ha observado disfunción hepática significativa. Después del estudio clínico de DT₃₈₈GMCSF, establecimos un modelo preclínico para la toxicidad hepática utilizando moléculas de fusión de DT con GMCSF e IL-3 murinos, DT₃₈₈mGMCSF y DT₃₈₈mIL-3, respectivamente. 27 ratas tratadas con DT₃₈₈mGMCSF, pero no con DT₃₈₈mIL-3, presentaron lesión de las células de Kupffer, tumefacción de hepatocitos y transaminasemia. La falta del receptor de IL-3 sobre las células de Kupffer parece proteger del daño hepático. Los estudios en monos y clínicos realizados hasta la fecha confirman ese hallazgo.

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

Tabla 3. Resultados de las toxicidades, respuesta inmunitaria y respuesta clínica de pacientes tratados con DT₃₈₈IL3*

N.º de paciente	Nivel de dosis (µg/kg)	Toxicidades grado 2 CTCV3	Anticuerpo anti-DT(µg/mL)		
			d1	d15	d30
1	4	N-V, Trans	0,8	23	235
2	4	0	2,5	ND	ND
3	4	F, N-V, Alb, Hipo	0	ND	36
4	4	F, Alb	0	ND	ND
5	4	F, Alb	0	ND	48
6	4	Hipo	0,9	ND	36

7	4	Alb	2,2	1	6,2
8	5,32	Alb	1	221	263
9	5,32	Alb, Trans	0,8	440	ND
5 10	5,32	Alb	0,5	ND	1,1
11	5,32	F, Alb, Trans	2,5	ND	ND
12	5,32	Hipo, F, Alb	1,3	600	ND
13	5,32	Alb	1,5	ND	ND
14	5,32	Alb, Trans	0,3	0,3	ND
10 15	5,32	Alb, Trans	0	1,6	29
16	7,07	Alb, Trans	1	0	ND
17	7,07	Alb	1,2	ND	ND
18	7,07	F, Alb, Disn	0,7	0,4	ND
15 19	7,07	VLS, Alb, Disn	0,8	8,3	22,4
20	7,07	Alb, Trans	0,4	ND	ND
21	7,07	Alb, Trans	2,1	1,5	4,2
22	7,07	Alb, Trans	1,7	1,2	ND
20 23	7,07	F, Alb, VLS	2,2	32	104
24	7,07	0	4,3	ND	4
25	7,07	Alb	3,8	ND	ND
26	7,07	F, Alb, Trans	0,5	ND	ND
27	9,4	F, Alb, Trans	3	ND	ND
25 28	9,4	F, Alb	1,3	300	ND
29	7,07	F, Alb	1,5	ND	ND
30	9,4	Alb	3	0,8	ND
31	9,4	F, Trans	2,3	ND	ND
30 32	9,4	Alb, Trans	2,2	3,1	ND
33	9,4	Alb, Trans	1,2	ND	ND
34	9,4	Alb, Trans	2,2	ND	306
35	9,4	Alb	0,8	252	ND
35 36	12,5	Alb, Trans	1,3	11,2	16,8

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

40	Tabla 4. Nivel de dosis y efectos tóxicos relacionados con el fármaco de pacientes con LMA tratados con DT₃₈₈IL3		
	N.º de paciente	Dosis µg/kg/día	Efectos secundarios de grado 2 o superior relacionados con el fármaco (grado de toxicidad CTC)
	1	4	Náuseas de grado 2; vómitos de grado 2; ALT de grado 2
45	2	4	Ninguno
	3	4	Hipotensión de grado 2; taquicardia sinusal de grado 2; fiebre de grado 2; aumento de peso de grado 2; náuseas de grado 2; vómitos de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2;
	4	4	Fiebre de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2
50	5	4	Fiebre de grado 2; rigores/escalofríos de grado 2; CPK de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2
	6	4	Hipotensión de grado 2; hipocalcemia de grado 2
	7	4	Hipoalbuminemia de grado 2
55	8	5,32	Hipoalbuminemia de grado 2
	9	5,32	Hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2; AST de grado 2; ALT de grado 2
	10	5,32	Taquicardia supraventricular de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2
60	11	5,32	Fiebre de grados 2; hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2; AST de grado 2; ALT de grado 2
	12	5,32	Hipotensión de grado 2; fiebre de grado 2; rigores/escalofríos de grado 2; aumento de peso de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2
	13	5,32	Hipoalbuminemia de grado 2
65	14	5,32	Hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2; ALT de grado 2

15	5,32	Fatiga de grado 2; rigores/escalofríos de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2; ALT de grado 2
16	7,07	Hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2; ALT de grado 2
17	7,07	Hipoalbuminemia de grado 2
18	7,07	Hipertensión de grado 2; fatiga de grado 2; fiebre de grado 2; exantema/descamación de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; debilidad muscular de grado 2, en todo el cuerpo/generalizada; disnea de grado 2
19	7,07	Síndrome de fuga vascular agudo de grado 2; hipertensión de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2; disnea de grado 2; hipoxia de grado 2
20	7,07	Hiperbilirrubinemia de grado 2; hiperglucemia de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; hipocalcemia de grado 2; AST de grado 2; ALT de grado 2
21	7,07	Hipoalbuminemia de grado 2, AST de grado 2, ALT de grado 2
22	7,07	Ninguno
23	7,07	Fiebre de grado 2; hipocalcemia de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2; síndrome de fuga vascular agudo de grado 2
24	7,07	Ninguno
25	7,07	Hipoalbuminemia de grado 2
26	7,07	AST de grado 2
27	9	Fiebre de grado 2; ALT de grado 2; hipoalbuminemia de grado 2

Tabla 5. Respuestas clínicas a DT ₃₈₈ IL3			
N.º de paciente	% de blastos pretratamiento	Respuesta global	Duración de la respuesta (meses)
9	50 %	RP	1
13	69 %	RM con reducción de 93 %*	2
14	90 %	RM con reducción de 89 %*	1
15	80 %	RM con reducción de 90 %*	1
19	30 %	RC	continúa durante >6
23	39 %	RP	continúa durante >2
*Citoreducción calculada a partir del cambio en el índice de blastos medulares = % de blastos × % de celularidad.			

6.2 Ejemplo 2 (ilustrativo)

6.2.1 Pacientes y métodos

Los pacientes debían tener LMA, basada en una biopsia de médula ósea, y enfermedad, recidiva de la enfermedad, enfermedad resistente o LMA de bajo riesgo (SMD previo relacionado con el tratamiento, edad del paciente >70 años, o citogenética desfavorable y no candidato para trasplante alogénico). Los pacientes debían tener un estado funcional <2, WBC <10 000/ml, bilirrubina <1,5 mg/dL, transaminasas <2,5 veces el límite superior de la normalidad, albúmina >3 g/dL, creatinina <1,5 mg/dL, reserva cardíaca adecuada (EF >40 %), concentración sérica pretratamiento con anti-DT <2,4 mg/ml, estar dispuestos a dar el consentimiento informado y ser tratados en un sitio autorizado, estar dispuestos a utilizar una forma autorizada de control de la natalidad mientras estuvieran en el estudio, no tener problemas médicos graves simultáneos, infecciones no controladas, CID o embarazo, no tener leucemia activa en el SNC, no haber tenido un infarto de miocardio en los últimos seis meses, no necesitar oxígeno, y no tiene alergia a DT.

Los pacientes recibieron infusiones de 15 minutos de DT₃₈₈IL-3 tres veces a la semana durante dos semanas, con aumento de dosis interpaciente en dosis de 4-12,5 µg/kg/dosis.

6.2.2 Resultados - Características de los pacientes

Hasta la fecha, se han cribado setenta y cinco pacientes con LMA y se han tratado treinta y seis pacientes (Tabla 6). La mediana de edad de los pacientes tratados era 60 años (intervalo, 25-81 años). Había veinte hombres y dieciséis mujeres. La enfermedad era LMA de primera aparición en cuatro, LMA de primera recidiva en once, LMA de segunda recidiva en ocho, y LMA resistente en doce pacientes. Un paciente tenía SMD. Siete pacientes con LMA tenían antecedentes de SMD, y uno tenía antecedentes de LMA secundaria. Un paciente de cada había recibido previamente un trasplante autólogo o alogénico de células madre. La citogenética era desfavorable en doce, lo que incluye al paciente con SMD, intermedia en veintiuno, y no se había realizado en tres. Siete pacientes fueron tratados con 4 mg/kg, ocho pacientes fueron tratados con 5,3 µg/kg, doce pacientes fueron tratados con 7,1 mg/kg, ocho pacientes tratados con 9,4 µg/kg y un paciente tratado con 12,5 µg/kg DT₃₈₈IL-3.

Tabla 6. Características clínicas de pacientes con LMA tratados con DT ₃₈₈ IL3					
N.º de paciente	Edad (años)/sexo	Estado de enfermedad	Antecedentes terapéuticos	Citogenética	
1	38/M	1.ª recidiva	7 + 3; HiDAC	Normal	
2	53/F	2.ª recidiva	7 + 3/Ida/Ara-C; 7 + 3/Ida/Ara-C; 5 + 3/Ida/Ara-c Mylotarg	+8	
3 ^b	67/F	1.ª recidiva	Carbo/Taxol; Gleevec, después Ida/Citarabina; Mylotarg	-4, -18, -19, del 5, +7	
4 ^a	67/F	2.ª recidiva	Ida/Ara-C; Mylotarg; Campath/Cytosan; trasplante alogénico de células madre; Mylotarg; DLI; DLI; Mylotarg; DLI	Normal	
5	57/M	1.ª recidiva	7 + 3/Citarabina/Dauno; 5 + 2/Citarabina/Dauno; Citarabina/Mylotarg; Cytosan/VP-18	+13	
6 ^a	54/M	2.ª recidiva	Ara-C/Ida; Ara-C/Gem/CPT-11; Ara- C/etopósido; trasplante de células madre; Busulphace/VP-18; trasplante autólogo de células madre	-7	
7 ^b	51/M	2.ª recidiva	7 + 3 + 3; Ara-C/L-asparaginasa; Ara- C/VP-16, Busulfán/ VP-16 más trasplante autólogo de células madre; Ara-C/Mito/L-asparaginasa; Ara-C/Mito/L-asparaginasa; Mylotarg	t (6; 12)	
8	82/M	1.ª recidiva	Citarabina/Dauno	t(3; 21)(q26; q26)	
9	83/M	1.ª recidiva	Citarabina/Dauno	Normal	
10	89/M	1.ª recidiva	Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C	Normal	
11	54/F	Resistente	ERYC/Ida (7 + 3); ERYC	Normal	
12	81/F	<i>De novo</i>		+8, +9	
13	78/M	2.ª recidiva	Ida/Ara-C; VP16/Mito/Ara-C; Mylotarg; Vion/Timidor; Gem/Fludarabina/Mito	Normal	
14	67/F	Resistente	Inducción de ERYC/Ida (7 + 3)	t(11; 18) (q25; q21), del (9) (p22p24); +8	
15	25/F	2.ª recidiva	Terapia de inducción 7 + 3; mini VP- 16/Cytosan/ Ara-C; reinducción de CECA, seguido de 7 + 3	t(9; 11) (p22; q23)	
16	44/F	Resistente	HiDAC/dauno; VP-16/Ciclofosfamida	Normal	
17	62/M	Resistente	Terapia de inducción 7 + 3; 6 + 2/Citarabina/Asparaginasa; Clorotoxina/Temodar; Mitn/Gem/Fludarabina	t(1; 4) (q42; q21), t(4; 12) (q12; p13) del(7) (q22)	
18	62/F	1.º recidiva	Inducción 7 + 3	Normal	
19	72/F	Resistente	Inducción 7 + 3	Normal	
20	62/M	1.ª recidiva	Citarabina/Ida	add (2) (p21), add (3) (p25), -4, -7, si del (17) (q23), sdll, del (11) (q23)	
21 ^b	59/F	1.ª recidiva	Ara-C/dauno; rescate con VP-16/ciclo	t(1; 5)	
22	32/M	Resistente	Ara-C/dauno; VP-16/Mito; Ara-C/dauno; VP- 16/Cytosan	del (7) (q22q34)	
23	73/F	1.ª recidiva	Ciclosporina, daunorubicina, citarabina	+11, -12, der (17) t (12; 17) (q10; p12)	
24	33/M	2.ª recidiva	ADE-10; MACE/Midac; Hydrea/leucoforesis; Citosina/Ara-C	Normal	
25 ^b	66/F	Resistente	Revlimid, 7 + 3, L-001281814/MK0457	del (5) (q23), -12, -13, add (16) (q22), + mer 20	
26	73/F	Resistente	Ara-C/dauno; 7 + 3	Normal	
27	70/F	<i>De novo</i>		ND	
28	60/M	Resistente	7 + 3	del (5)	
29	41/F	2.º recidiva	7 + 3; Hi-Dos Citarabina; reinducción 7 + 3	Normal	
30	32/M	Resistente	HiDAC/dauno; VP-16/Ciclofosfamida; HiDAC	ND	

Tabla 6. Características clínicas de pacientes con LMA tratados con DT₃₈₈IL3

N.º de paciente	Edad (años)/sexo	Estado de enfermedad	Antecedentes terapéuticos	Citogenética
31 ^b	77/M	<i>De novo</i>		Normal
32 ^b	72/M	Resistente	Ara-C	–Y
33	78/M	1.º recidiva	7 + 3; Citarabina en dosis altas	Normal
34	77/M	<i>De novo</i>		ND
35 ^b	65/M	Resistente	7 + 3, Ara-C en dosis altas, PT-523	(q5), del (7), t (16; 17)
36	71/M	SMD	5-azacitidina; decitabina	–7

^a El paciente 4 recibió un trasplante alogénico y el paciente 6 recibió un trasplante autólogo.

^b El paciente 3 tenía antecedentes de LMA secundaria. Los pacientes 7, 21, 25, 31, 32 y 35 tenían antecedentes previos de SMD.

6.2.3 Resultados – Toxicidades

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

Tabla 7. Resultados de toxicidades, farmacocinética, respuesta inmunitaria y respuesta clínica de pacientes tratados con DT388IL3*

N.º de paciente	Nivel de dosis (µg/kg)	Toxicidades de grado 2 CTCV3	Cmáx d1/d12 (mg/mL)		Anticuerpo anti-DT (mg/mL)			Respuesta clínica
					d1	d15	d30	
1	4	N-V, Trans	0	0	0,8	23	235	0
2	4	0	0	0	2,5	ND	ND	0
3	4	F, N-V, Alb, Hipo	0	0,18	0	ND	36	0
4	4	F, Alb	ND	ND	0	ND	ND	0
5	4	F, Alb	ND	ND	0	ND	48	0
6	4	Hipo	ND	ND	0,9	ND	36	0
7	4	Alb	0	0	2,2	1	6,2	0
8	5,32	Alb	0,19	0	1	221	263	0
9	5,32	Alb, Trans	0,14	0,15	0,8	440	ND	RP
10	5,32	Alb	0,22	ND	0,5	ND	1,1	0
11	5,32	F, Alb, Trans	0	ND	2,5	ND	ND	0
12	5,32	Hipo, F, Alb	0,34	0	1,3	600	ND	0
13	5,32	Alb	0	0,3	1,5	ND	ND	RM
14	5,32	Alb, Trans	0,38	0,36	0,3	0,3	ND	RM
15	5,32	Alb, Trans	0,06	0,29	0	1,6	29	RM
16	7,07	Alb, Trans	ND	0,21	1	0	ND	0
17	7,07	Alb	ND	ND	1,2	ND	ND	0
18	7,07	F, Alb, Disn	0,22	0,37	0,7	0,4	ND	0
19	7,07	VLS, Alb, Disn	0,32	0,54	0,8	8,3	22,4	RC
20	7,07	Alb, Trans	0,48	ND	0,4	ND	ND	0
21	7,07	Alb, Trans	0,08	0,35	2,1	1,5	4,2	0
22	7,07	Alb, Trans	0,13	0,29	1,7	1,2	ND	0
23	7,07	F, Alb, VLS	0,61	ND	2,2	32	104	RP
24	7,07	0	0	0,38	4,3	ND	4	0
25	7,07	Alb	0,11	ND	3,8	ND	ND	0
26	7,07	F, Alb, Trans	0,23	ND	0,5	ND	ND	0
27	9,4	F, Alb, Trans	0,18	ND	3	ND	ND	0
28	9,4	F, Alb	0,27	ND	1,3	300	ND	0
29	7,07	F, Alb	ND	ND	1,5	ND	ND	0
30	9,4	Alb	0,15	0,32	3	0,8	ND	0
31	9,4	F, Trans	0,23	ND	2,3	ND	ND	0
32	9,4	Alb, Trans	0,26	0,38	2,2	3,1	ND	0
33	9,4	Alb, Trans	0,37	ND	1,2	ND	ND	0

34	9,4	Alb, Trans	0,55	ND	2,2	ND	306	0
35	9,4	Alb	0,23	0	0,8	252	ND	0
36	12,5	Alb, Trans	0,34	ND	1,3	11,2	16,8	RP

F = fiebre, N-V = náuseas y vómitos, Trans = transaminasemia, VLS = síndrome de fuga vascular, Alb = hipoalbuminemia, Hipo = hipotensión, Disn = disnea, ND = no determinado, RM = respuesta mínima, RP = respuesta parcial, RC = respuesta completa.

6.2.4 Resultados -Respuesta inmunitaria

Los títulos de anticuerpos pretratamiento variaron de 0 a 4,3 µg/ml (media = 2,3 µg/ml); los títulos de anticuerpos del día 15 fueron de 0 a 600 µg/ml (media = 92 µg/ml); los títulos de anticuerpos del día 30 fueron de 1,1 a 306 µg/ml (media = 81 µg/ml). Basándose en los títulos de anticuerpos altos, de >8 µg/ml, las 25 muestras presentaron valores bajos pretratamiento; nueve muestras presentaron valores bajos en el día 15 y nueve muestras presentaron valores altos en el día 15; cuatro muestras presentaron valores bajos en el día 30 y diez muestras presentaron valores altos en el día 30. La $C_{máx}$ no se correlacionó con la respuesta ($p = 0,23$).

6.2.5 Resultados - Respuesta clínica

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

Tabla 8. Respuestas clínicas a DT ₃₈₈ IL3				
N.º de paciente	Nivel de dosis	% de blastos pretratamiento	Respuesta global	Duración de la respuesta (meses)
9	5,32	50 %	RP	1
13	5,32	69 %	RM con reducción de 93 %*	2
14	5,32	96 %	RM con reducción de 89 %*	1
15	5,32	80 %	RM con reducción de 90 %*	1
19	7,07	30 %	RC	8
23	7,01	39 %	RP	3
36	12,5	10 %	RP	>1

*Citorreducción calculada a partir del cambio en el índice de blastos medulares = % de blastos × % de celularidad.

7. Equivalentes

La presente invención no está limitada en cuanto a su alcance por las realizaciones específicas descritas, que están destinadas a ser simples ilustraciones de aspectos individuales de la presente invención.

De hecho, diversas modificaciones de la presente invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos utilizando simplemente experimentación rutinaria.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina (IL)-3 humana-toxina diftérica para utilización en un método para tratar la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) en un humano, en donde dicho método comprende administrar dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica a dicho humano.
2. La composición farmacéutica para utilización según la reivindicación 1, en donde la administración de dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica da como resultado la inhibición del crecimiento de células de LMMC en dicho humano.
3. La composición farmacéutica para utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método comprende administrar dicho conjugado de IL3 humana-toxina diftérica:
 - (i) en una dosis de aproximadamente 4 µg/kg al día a aproximadamente 12,5 µg/kg al día;
 - (ii) en una dosis de aproximadamente 5,3 µg/kg al día, aproximadamente 7,1 µg/kg al día, aproximadamente 9,4 µg/kg al día, o aproximadamente 12,5 µg/kg al día; o
 - (iii) en una dosis que es la dosis máxima tolerada.
4. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método comprende administrar dicho conjugado de IL3 humana-toxina diftérica:
 - (i) al menos dos veces a la semana;
 - (ii) al menos tres veces a la semana;
 - (iii) tres veces en una semana;
 - (iv) durante un periodo de dos semanas o más; o
 - (v) una vez al día durante cinco días.
5. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el conjugado se administra durante múltiples ciclos.
6. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el humano tiene citogenética anómala.
7. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjugado es un conjugado químico o en donde el conjugado es una proteína expresada recombinantemente.
8. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el conjugado es expresado como un solo polipéptido que comprende los dominios catalítico y de translocación de toxina diftérica e IL-3 humana.
9. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el conjugado comprende los residuos de aminoácido 1 a 388 de toxina diftérica enlazada mediante un enlace peptídico a IL-3 humana.
10. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el humano:
 - (i) está en un estado de remisión de la LMMC;
 - (ii) ha recidivado de LMMC;
 - (iii) ha fracasado con el tratamiento previo para la LMMC;
 - (iv) es resistente a otras terapias para la LMMC;
 - (v) es propenso a reacciones adversas de otras terapias para la LMMC; o
 - (vi) no ha sido tratado previamente para la LMMC.
11. La composición farmacéutica para utilización según la reivindicación 10, en donde el tratamiento previo para la LMMC comprende azacitidina y/o decitabina.
12. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el humano ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico convencional y/o se ha sometido a radioterapia.
13. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde se está administrando actualmente al humano un agente quimioterapéutico convencional distinto de un conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica y/o se está sometiendo a radioterapia.

14. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el humano es resistente a la quimioterapia.
- 5 15. La composición farmacéutica para utilización según la reivindicación 14, en donde la quimioterapia comprende azacitidina y/o decitabina.
- 10 16. La composición farmacéutica para utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho método comprende además administrar azacitidina y/o decitabina.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

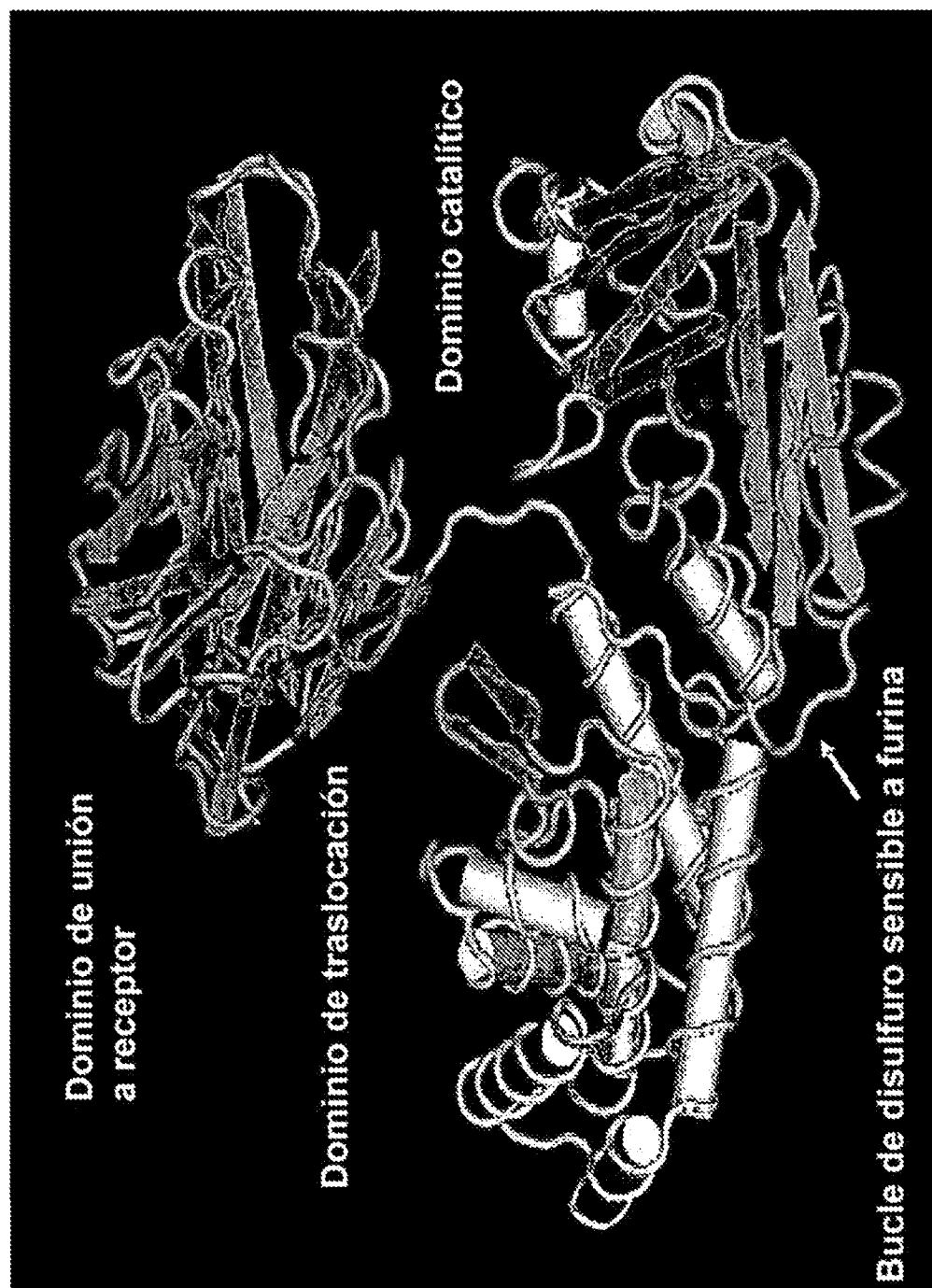


Figura 1

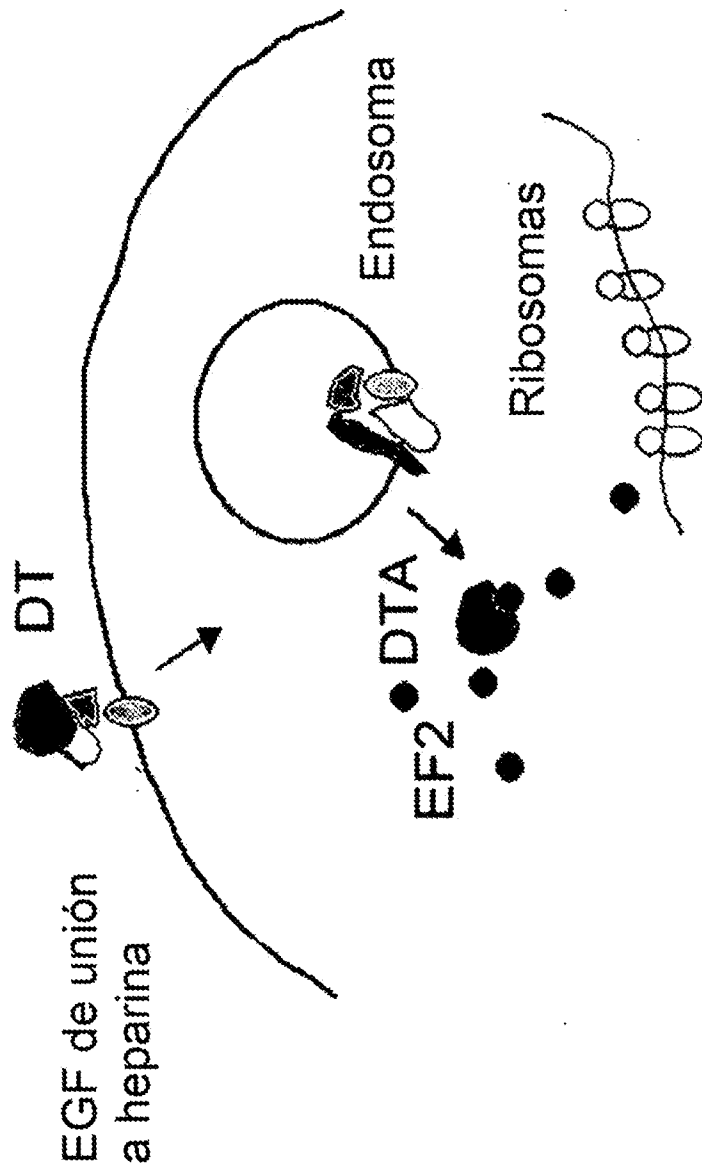


Figura 2



Figura 3

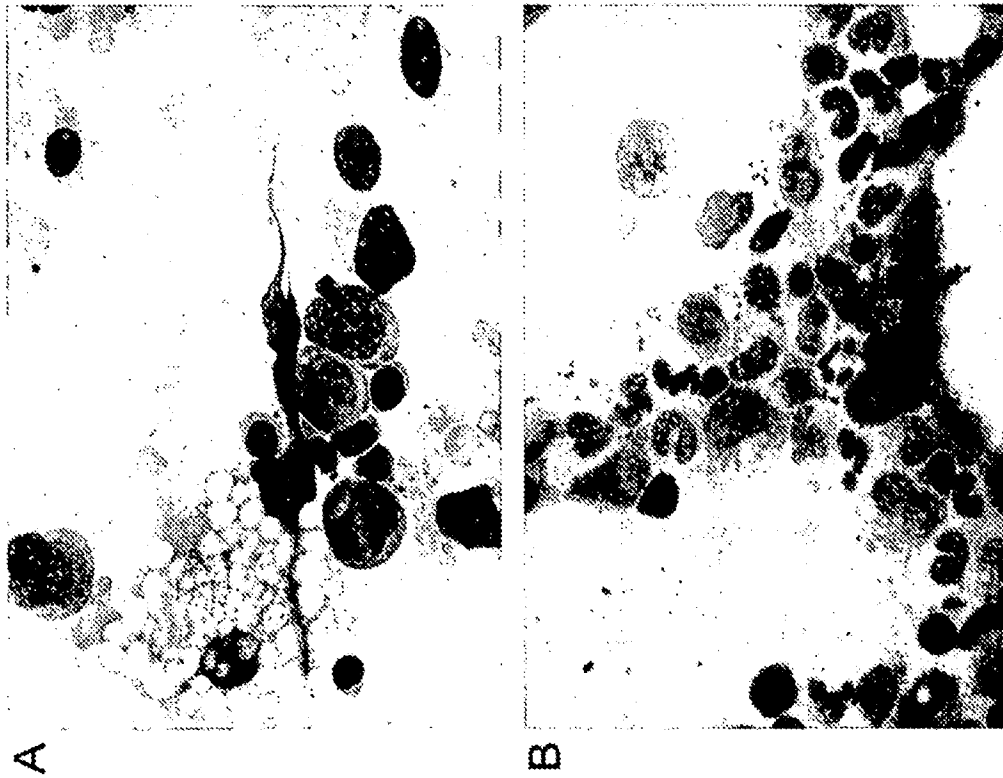


Figura 4

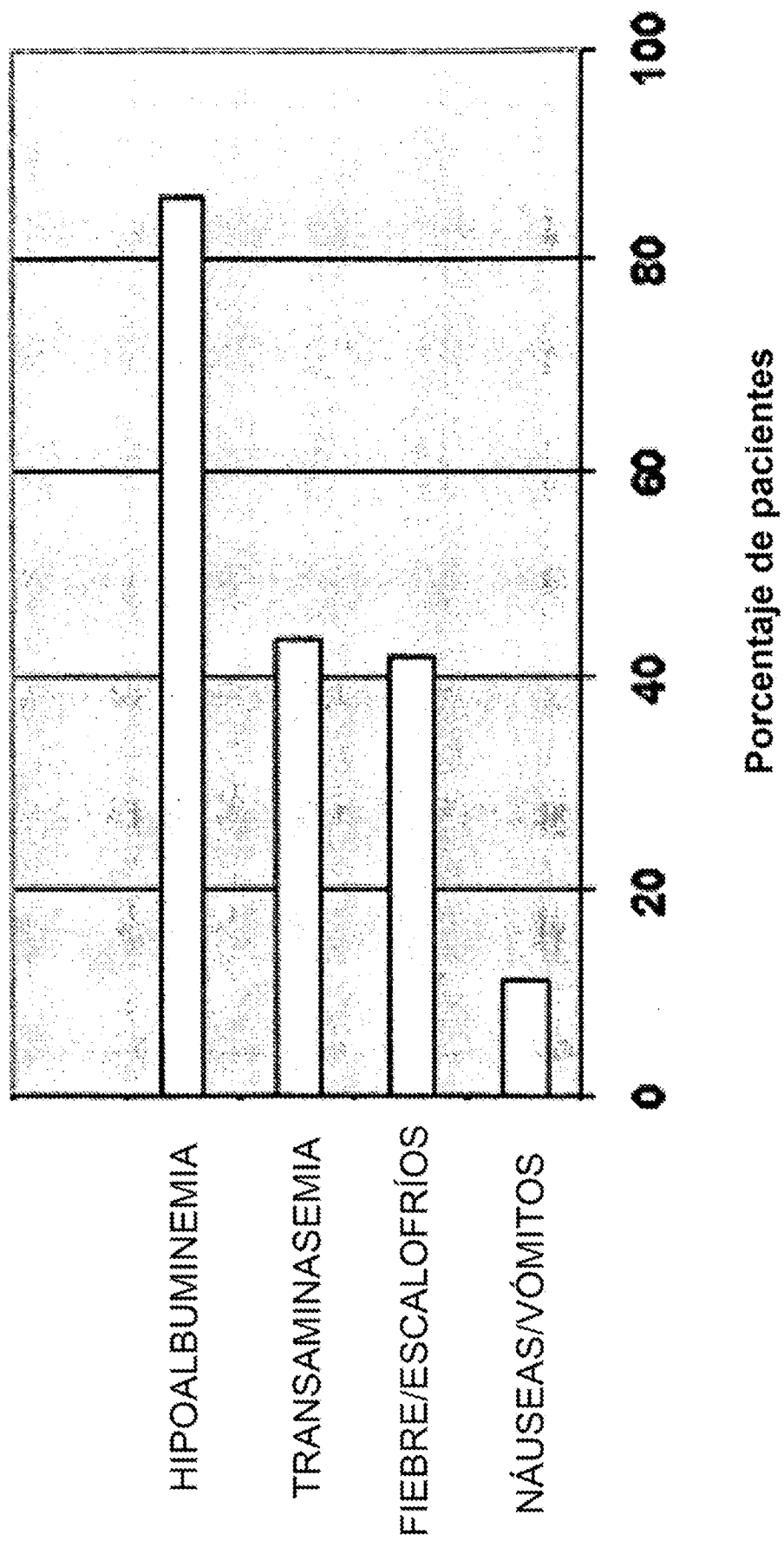


Figura 5

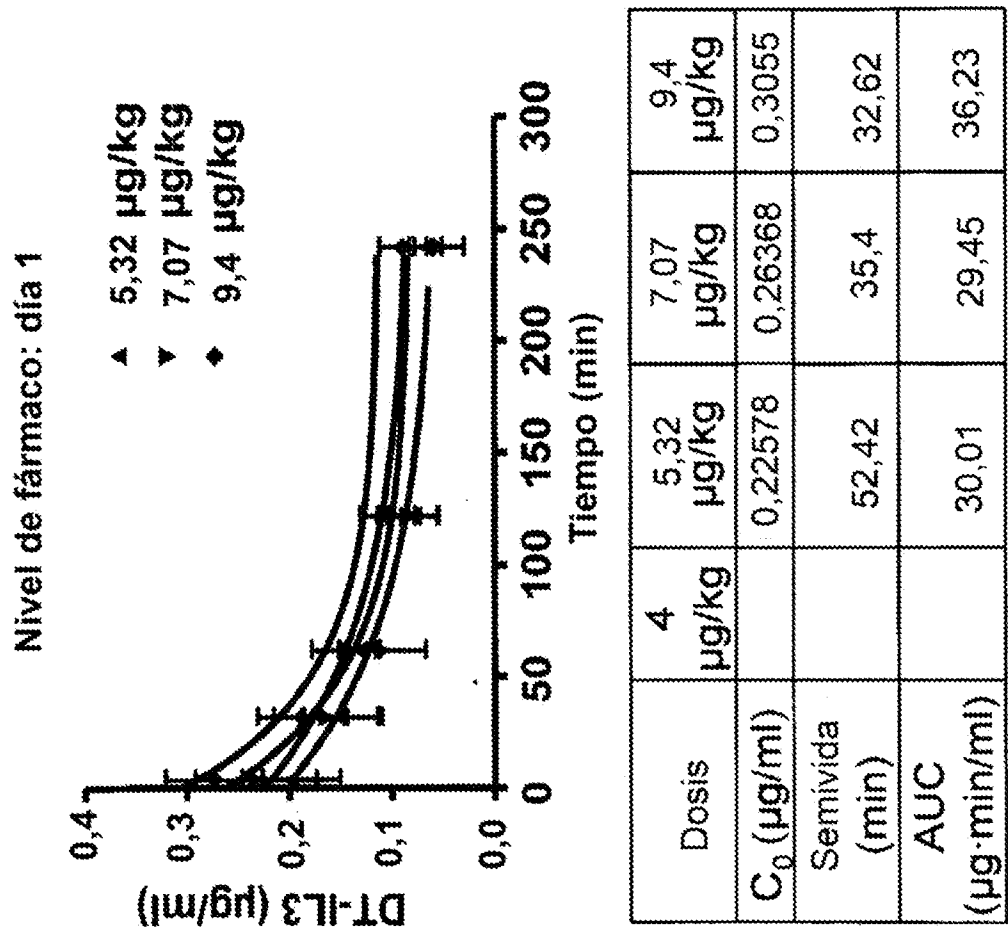


Figura 6A

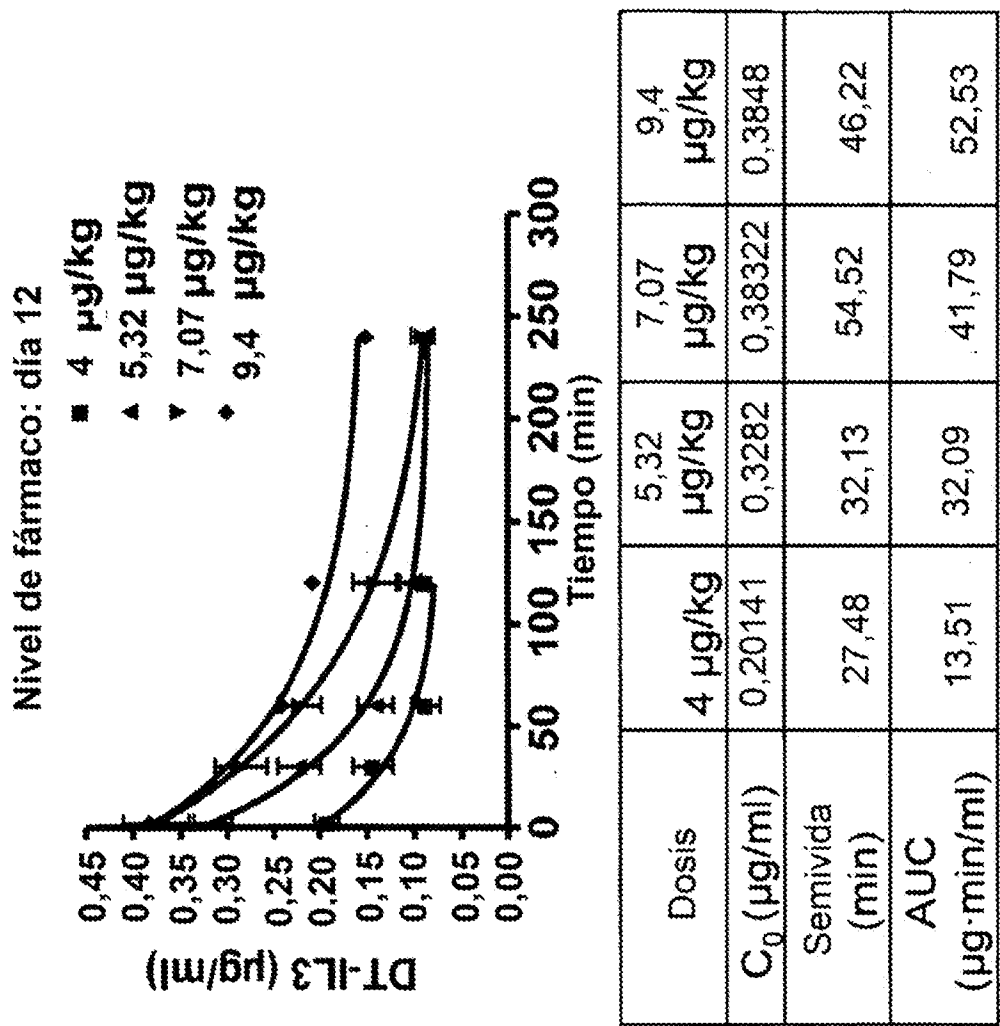


Figura 6B

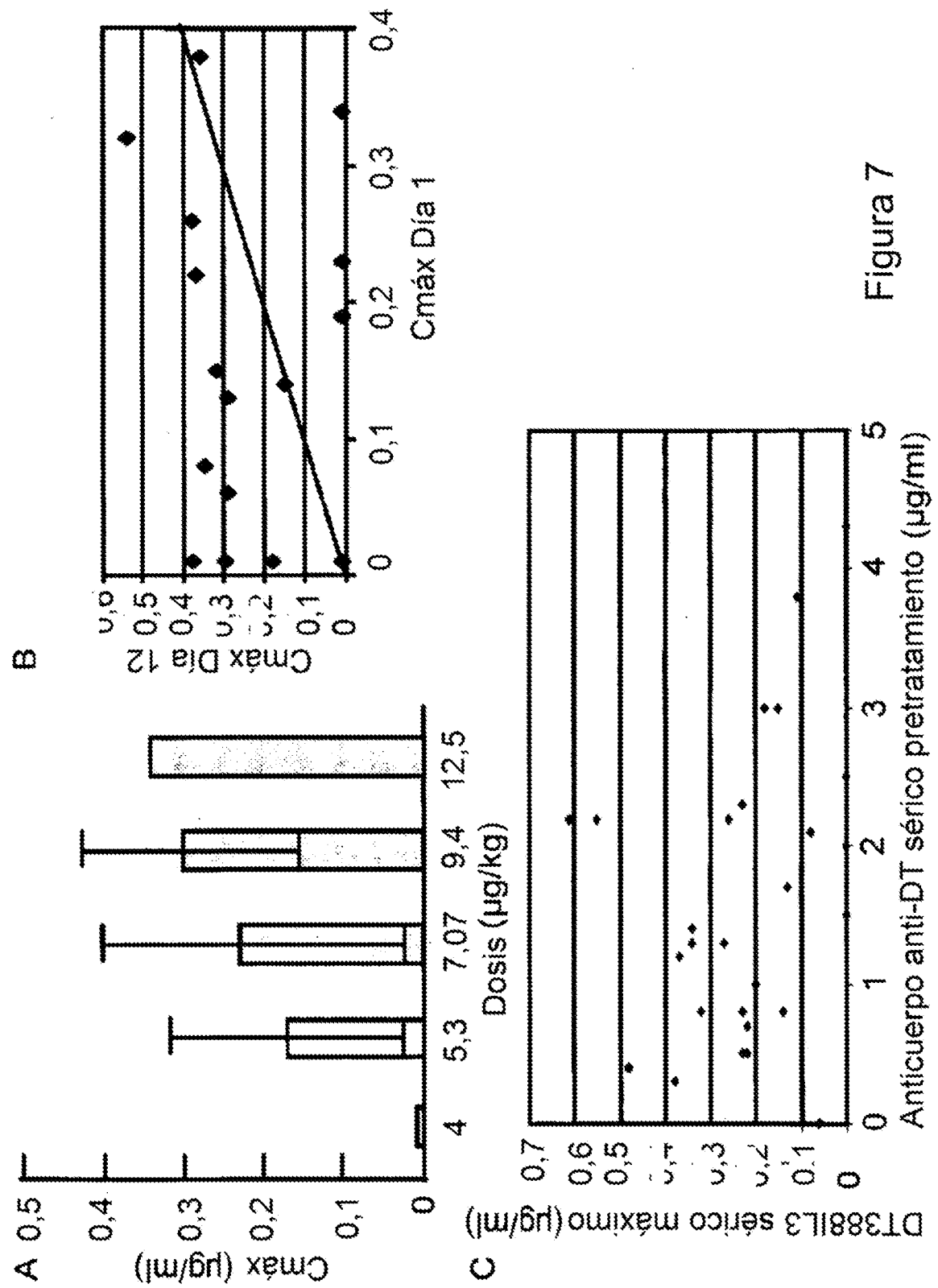


Figura 7

POSTRATAMIENTO



PRETRATAMIENTO

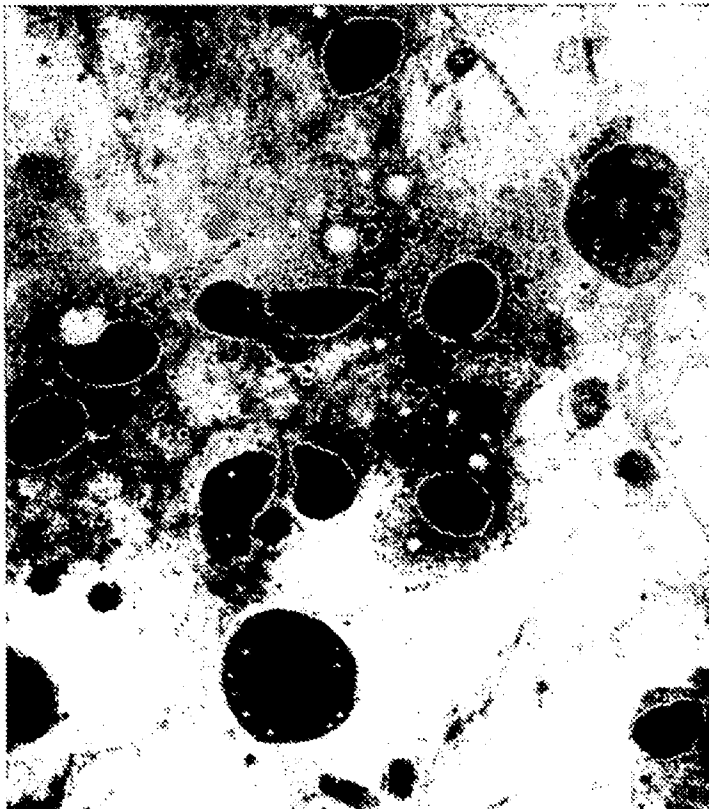


Figura 8A

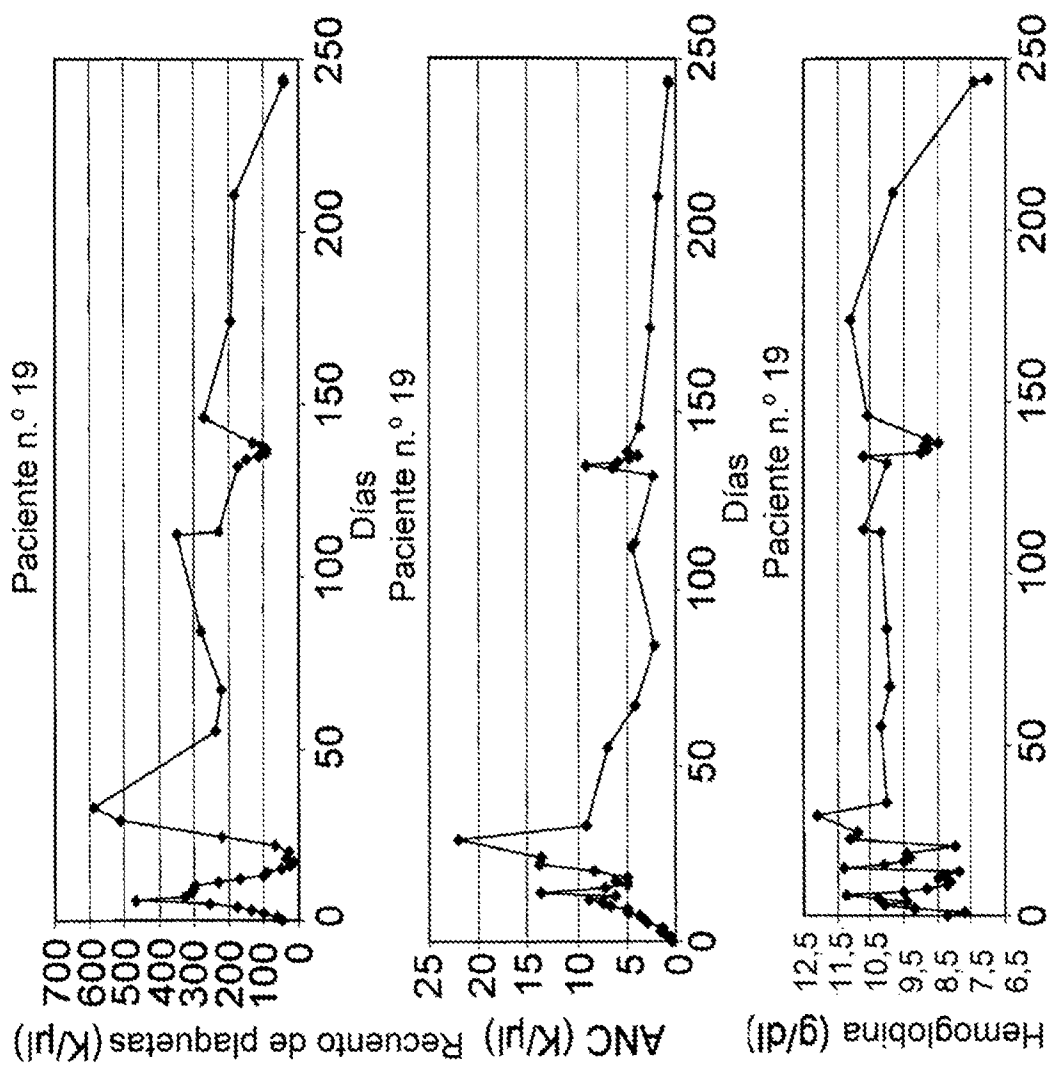
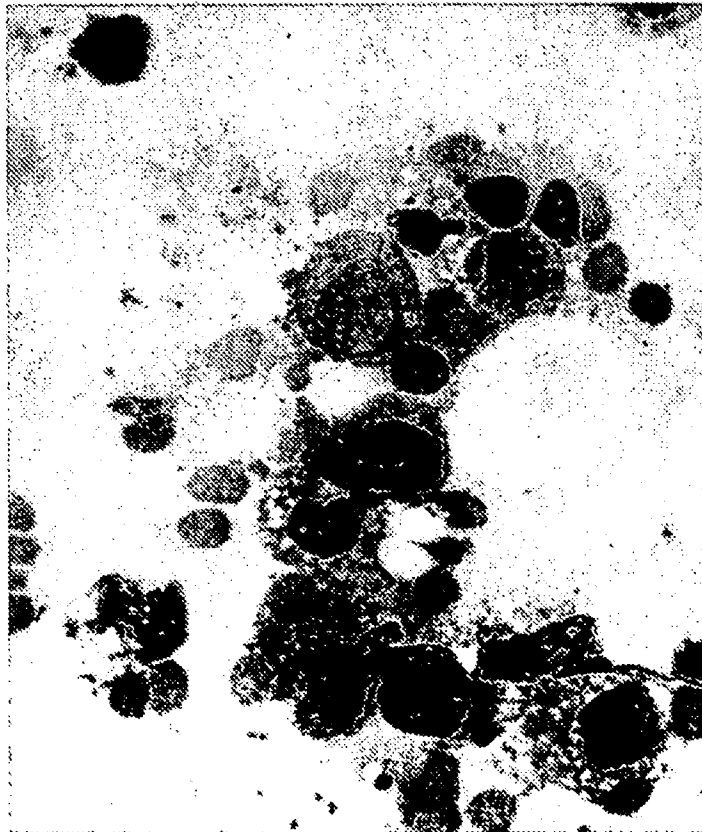


Figura 8B

PRETRATAMIENTO



POSTRATAMIENTO

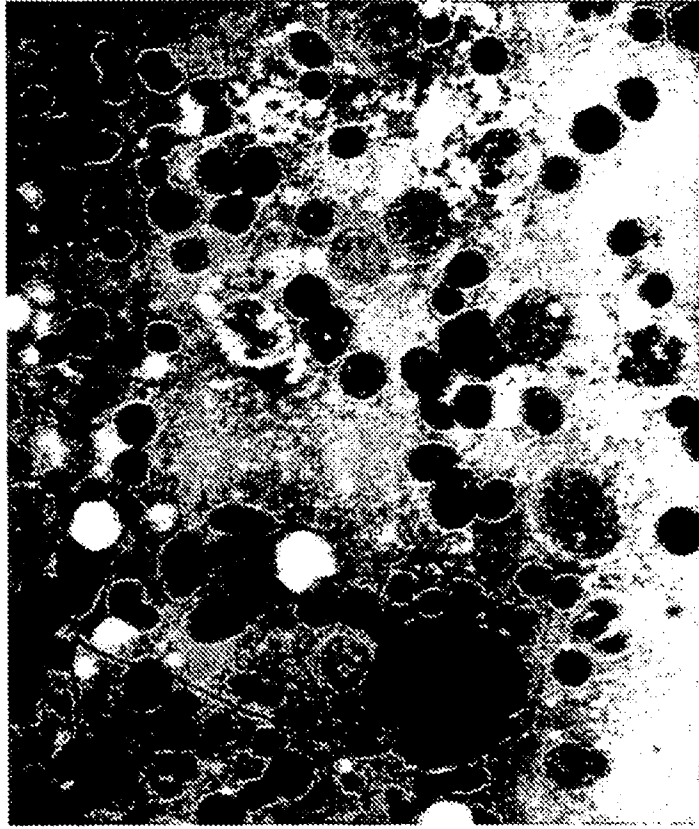


Figura 8C

Figura 8D

