

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 402**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2007 E 17151480 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **19.08.2020 EP 3207941**

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

30 Prioridad:

07.09.2006 US 843471 P

01.06.2007 US 932772 P

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

09.06.2021

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:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

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

ES 2 781 402 T7

DESCRIPCIÓN

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

5 1. Campo de la invención

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

2. Antecedentes de la invención

25 2.1 Terapia para el cáncer

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

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

Otros tipos de terapias para el cáncer tradicionales incluyen cirugía, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia de antiangiogénesis, terapia dirigida (por ejemplo, terapia dirigida a una diana de cáncer tal como Gleevec® y otros inhibidores de tirosina cinasas, Velcade®, Sutent®, y otros), y tratamiento de radiación para erradicar células neoplásicas en un paciente (véase, por ejemplo, Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management", en *Scientific American: Medicine*, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Cap. 12, secc. IV). Todos estos enfoques pueden plantear inconvenientes significativos para el paciente, que incluyen una falta de eficacia (en términos de resultado a largo plazo (por ejemplo, debido al fallo en dirigirse a células madre cancerosas) y toxicidad (por ejemplo, debido a efectos no específicos sobre tejidos normales)). En consecuencia, se necesitan nuevas terapias para mejorar las perspectivas a largo plazo de los pacientes con cáncer.

2.2 Células madre cancerosas

Las células madre cancerosas comprenden una subpoblación única (frecuentemente 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 quiescentes, y con frecuencia relativamente más quimiorresistentes que la masa tumoral. Dado que las terapias y regímenes convencionales han sido diseñados, en gran parte, para atacar células que proliferan rápidamente (es decir, aquellas células cancerosas que comprenden la masa tumoral), las células madre cancerosas que son frecuentemente de crecimiento lento pueden ser relativamente más resistentes que la masa tumoral de crecimiento más rápido, a las terapias y regímenes convencionales. Las células madre cancerosas pueden expresar otras características que las hace relativamente quimiorresistentes tales como vías de resistencia a múltiples fármacos y antiapoptóticas. Lo anteriormente mencionado constituiría un motivo clave para el fracaso de los regímenes de tratamiento de oncología estándar para garantizar el beneficio a largo plazo en la mayoría de los pacientes con cánceres de estadio avanzado – es decir, el fracaso de dirigirse adecuadamente a y erradicar células madre cancerosas. En algunos casos, una(s) célula(s) madre cancerosa(s) es la célula iniciadora de un tumor (es decir, es el progenitor de las células cancerosas que comprenden la masa tumoral).

Se han identificado células madre cancerosas en una gran variedad de tipos de cáncer. Por ejemplo, Bonnet y otros, mediante el uso de citometría de flujo, fueron capaces de aislar las células de leucemia que portaban el fenotipo específico CD34+ CD38-, y posteriormente demostraron que son estas células (que comprenden <1 % de una leucemia dada), a diferencia del 99+ % restante de la masa de leucemia, las que son capaces de recapitular la leucemia desde cuando se derivó cuando se transfirió en ratones inmunodeficientes. Véase, por ejemplo, "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell", *Nat. Med.* 3:730-737 (1997). Es decir, estas células madre cancerosas se encontraron como <1 en 10 000 células de leucemia, aunque a esta baja frecuencia la población era capaz de iniciar y transferir en serie una leucemia humana en ratones con inmunodeficiencia combinada grave/diabéticos no obesos (NOD/SCID) con el mismo fenotipo histológico que en el tumor original.

Cox y otros identificaron pequeñas subfracciones de células de leucemia linfoblástica aguda (LLA) humana que tenían los fenotipos CD34+/CD10- y CD34+/CD19-, y fueron capaces de injertar tumores de LLA en ratones inmunocomprometidos - es decir, las células madre cancerosas. Al contrario, no se observó injerto de los ratones mediante el uso de la masa de LLA, a pesar de inyectar, en algunos casos, 10 veces más células. Véase Cox y otros, "Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells", *Blood* 104(19): 2919-2925 (2004).

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

Kondo y otros 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 recapitular gliomas en ratones inmunocomprometidos. Véase Kondo y otros, "Persistence of a small population of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:781-786 (2004). En este estudio, Kondo y otros determinaron que las líneas de células cancerosas contenían una población de las células madre cancerosas que conferían la capacidad de la línea de injertarse en ratones inmunodeficientes.

Se demostró que los cánceres de mama contenían una pequeña población de células con características de célula madre (que portaban marcadores de superficie CD44+CD24^{low} lin-). Véase Al-Hajj y otros, "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3983-3988 (2003). Tan solo 200 de estas células, correspondientes al 1-10 % de la población de células tumorales totales, son capaces de formar tumores en ratones NOD/SCID. Al contrario, la implantación de 20 000 células que carecían de este fenotipo (es decir, la masa tumoral) fue incapaz de hacer que el tumor creciera de nuevo.

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

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

Singh y otros identificaron células madre de tumor cerebral. Cuando se aislaron y trasplantaron en ratones desnudos, las células madre cancerosas CD133+, a diferencia de las células de masa tumoral CD133-, forman tumores que pudieron entonces ser trasplantados en serie. Véanse Singh y otros, "Identification of human brain tumor initiating cells",

Nature 432:396-401 (2004); Singh y otros, "Cancer stem cells in nervous system tumors", *Oncogene* 23:7267-7273 (2004); Singh y otros, "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors", *Cancer Res.* 63:5821-5828 (2003).

5 Ya que las terapias para el cáncer convencionales se dirigen a células que proliferan rápidamente (es decir, células que forman la masa tumoral), se cree que estos tratamientos son relativamente ineficaces en el direccionamiento y la alteración de células madre cancerosas. De hecho, se ha demostrado que las células madre cancerosas, que incluyen células madre de leucemia, son relativamente resistentes a terapias quimioterapéuticas convencionales (por ejemplo, Ara-C, daunorubicina), además de a terapias dirigidas más nuevas (por ejemplo, Gleevec®, Velcade®). Los ejemplos de células madre cancerosas de diversos tumores que son resistentes a quimioterapia, y el mecanismo mediante el cual son resistentes, se describen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1:

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

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

35 2.3 Leucemia mieloide aguda

Aproximadamente cuatro mil pacientes al año desarrollan leucemia mieloide aguda (LMA) en los Estados Unidos, Canadá y Europa. Véase, por ejemplo, Jamal y otros, *Cancer Statistics* 56:106-130 (2006). La LMA es la leucemia más común en adultos y la segunda leucemia más común en niños. Las hospitalizaciones prolongadas, asociadas al tratamiento y complicaciones, representan una parte significativa de los costes sanitarios en estas regiones. Además, incluso con inducción de combinación y quimioterapia de consolidación, la mayoría de los pacientes recaen finalmente y mueren de su enfermedad o complicaciones del tratamiento. Véase, por ejemplo, Brune y otros, "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 nuevas terapias. El direccionamiento selectivo de células madre de células de LMA puede proporcionar una terapia segura y más eficaz.

50 2.4 Síndrome mielodisplásico

Existen aproximadamente 20 000 nuevos casos de síndrome mielodisplásico (SMD) cada año en los Estados Unidos. Los pacientes con síndromes mielodisplásicos típicamente tienen bajos recuentos sanguíneos de al menos uno o más de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Tras el examen, típicamente se encuentra que la médula ósea es displásica o hiperplásica, que significa que hay demasiadas células madre sanguíneas que funcionan mal en la médula ósea. Un pequeño porcentaje de pacientes con SMD tienen médula ósea hipoplásica, que significa que hay muy pocas células madre sanguíneas en la médula ósea, que hacen que la enfermedad se parezca a la anemia aplásica. Casi la mitad de las personas con SMD no tienen síntomas en el momento del diagnóstico. Cuando los signos y síntomas se producen, pueden incluir anemia, debilidad, fatiga, cefalea, moretones, elevado sangrado, urticaria, fiebres, llagas en la boca y enfermedad prolongada. El SMD se produce a una frecuencia cada vez mayor en personas mayores, pero puede producirse en niños también. En menos de un tercio de los pacientes, el SMD progresa con el tiempo para llegar a convertirse en leucemia aguda. La edad promedio de diagnóstico es 70 años de edad. Los tratamientos para el SMD pueden variar considerablemente, dependiendo del tipo de SMD, la historia del paciente, y la edad y capacidad para tolerar ciertos regímenes de tratamiento. Las opciones de tratamiento incluyen cuidado de apoyo, agentes relacionados con la quimioterapia y trasplante de células madre (que típicamente se usa solo en pacientes de menos de 50). Sin embargo, la tasa de remisión para los tratamientos existentes es relativamente baja, y se necesitan nuevas terapias.

2.5 Interleucina-3

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

2.6 Toxina diftérica

La toxina diftérica (DT) es una proteína de 535 aminoácidos con tres dominios que consiste en un dominio catalítico (aminoácidos 1-186) conectado por un bucle de disulfuro rico en arginina a un dominio de translocación (aminoácidos 187-388) y un dominio de unión a célula (aminoácidos 389-535; Figura 1). Véase, por ejemplo, Choe y otros, "The crystal structure of diphtheria toxin", *Nature* 357: 216-222 (1992). La DT nativa se une al precursor de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina y CD9 en la superficie celular, experimenta endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, dinamina y ATP y, con acidificación del endosoma por ATPasa vesicular, el dominio de translocación de DT experimenta protonación de restos ácidos y la inserción espontánea en la membrana vesicular para formar canales de 18-22 Angstrom. El dominio catalítico se despliega y se escinde por furina en la vesícula y entonces el extremo C del dominio catalítico se transfiere a través del canal y se une a proteínas de coatómero, específicamente 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 en el replegamiento. El fragmento de DT entonces ribosila con ADP el factor de elongación 2 conduciendo a la inactivación de la síntesis de proteínas y muerte celular (Figura 2). Véase Ratts y otros, "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 nueva clase de agentes biológicos para oncología que se dirigen específicamente a receptores sobre las superficies de células cancerosas. Estos agentes típicamente consisten en una toxina truncada, que frecuentemente incluye los dominios catalítico y de translocación (pero no de unión a célula), fusionada a un ligando selectivo de célula que dirige la toxina a la diana prevista. Una tecnología tal implica la toxina diftérica (DT) recombinante. La DT es una proteína de 535 aminoácidos con tres dominios que consisten en un dominio catalítico (aminoácidos 1-186) conectado con un bucle de disulfuro rico en arginina a un dominio de translocación (aminoácidos 187-388) y un dominio de unión a célula (aminoácidos 389-535; Figura 1). Véase, por ejemplo, Choe y otros, "The crystal structure of diphtheria toxin", *Nature* 357: 216-222 (1992). La DT nativa se une al precursor de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina y CD9 sobre la superficie celular, experimenta endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina, dinamina y ATP, y, con acidificación de endosoma por ATPasa vesicular, el dominio de translocación de DT experimenta la protonación de restos ácidos y la inserción espontánea en la membrana vesicular para formar canales de 18-22 Angstrom. El dominio catalítico se despliega y se escinde por furina en la vesícula y entonces el extremo C del dominio catalítico se transfiere a través del canal y se une a 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 en el replegamiento. El fragmento DT entonces ribosila con ADP el factor 2 de elongación conduciendo a la inactivación de la síntesis de proteínas y muerte celular (Figura 2). Véase Ratts y otros, "A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol" *Proc Natl Acad Sci.*, 102: 15635-15640 (2005). Varios conjugados de DT recombinantes, que utilizan una forma truncada de DT, han sido expresados, purificados y probados en cultivo celular y se ha mostrado la toxicidad de células selectivas. Una toxina recombinante tal es el conjugado de DT₃₈₈IL-3, en donde la DT truncada mantiene su dominio catalítico y de translocación, pero no su dominio de unión a célula.

Se construyó DT₃₈₈IL-3 fusionando el gen que codifica los dominios catalítico y de translocación de DT (aminoácidos 1-388) a través de un conector Met-His con IL-3 humana. Véase, por ejemplo, Frankel y otros, "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 potentemente y selectivamente citotóxico para líneas celulares de LMA positivas para IL-3R y células de leucemia primaria derivadas de pacientes (véanse, Frankel y otros, "Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor", *Protein Eng.* 13: 575-581 (2000); Alexander y otros, "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 y otros "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 y otros "A diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein is cytotoxic to primitive acute myeloid leukemia progenitors but spares normal progenitors", *Cancer Res.* 62: 1730-1736 (2002)). Estudios adicionales encontraron que las variantes de alta afinidad del compuesto DT₃₈₈IL-3, llamadas DT388-IL3[K116W] (basándose en la mutación de una lisina en el aminoácido 116 a triptófano) y DT388IL3[Δ125-133] (basándose en una deleción de aminoácidos 125-133 en el dominio de IL3), había aumentado la potencia contra células de leucemia (véanse, Hogge y otros, "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 y otros, "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 ciertos modelos de ratón de leucemia humana (véanse, Black y otros, "Diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein (DT388IL-3) prolongs disease-free survival of leukemic immuno-compromised mice", *Leukemia*; 17: 155-159 (2003); Feuring-Buske y otros "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 y otros, "The efficacy of diphtheria-growth factor fusion proteins is enhanced by co-administration of cytosine arabinoside in an immunodeficient mouse model of human acute myeloid leukemia" *Leuk Res* 28: 1221-1226 (2004)). La seguridad se mostró a dosis terapéuticamente activas en roedores y monos (véanse, Black y otros, Black y otros, "Diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein (DT388IL-3) prolongs disease-free survival of leukemic immuno-compromised mice", *Leukemia*; 17: 155-159 (2003); Cohen y otros, "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 y otros, "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 un IND obtenido (BB IND núm. 11314) (véase, Urieto y otros, "Expression and purification of the recombinant diphtheria fusion toxin DT388IL-3 for phase I clinical trials", *Protein Exp. Purif.* 33: 123-133 (2004).

3. Resumen de la invención

La presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina-3 humana (IL-3)-toxina diftérica para su uso en un método de tratamiento de cáncer de células dendríticas plasmocitoides en un ser humano, en donde dicho método comprende administrar dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica a dicho ser humano, de acuerdo con las reivindicaciones. En un aspecto preferido de esta modalidad, se inhibe el crecimiento de cáncer de células dendríticas plasmocitoides en dicho ser humano.

En esta o cualquiera de las modalidades de la presente invención, el conjugado de interleucina-3-toxina diftérica puede comprender la interleucina-3 humana madura (que carece del péptido señal) de longitud completa conectada por un enlace covalente a la toxina diftérica. Preferentemente, la toxina diftérica está modificada porque el dominio de unión a la superficie celular se deletorea. Por ejemplo, el conjugado es un conjugado químico en el que la porción de toxina diftérica (los dominios catalíticos y de translocación de la toxina diftérica) y la porción de interleucina-3 están unidos químicamente juntos ya sea directamente o mediante un conector químico. Opcionalmente, el conjugado es un recombinante genético porque el conjugado se expresa como un único polipéptido. Cuando el conjugado es un conjugado recombinante, el conjugado traducido comprende preferentemente los dominios catalítico y de translocación de la toxina diftérica unidos a través de un enlace peptídico a la interleucina-3 humana. Con la máxima preferencia, el conjugado comprende los aminoácidos 1-388 de la toxina diftérica unidos a través de un conector peptídico a interleucina-3 humana.

En aspectos específicos de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 20 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 9 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de alrededor de 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. Además, el conjugado puede administrarse al menos dos veces a la semana o el conjugado puede administrarse al menos tres veces a la semana, al menos cuatro veces a la semana, al menos cinco veces a la semana, al menos seis veces a la semana, o siete veces a la semana. En un aspecto específico, donde el conjugado se administra más de una vez, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor cada vez. En particular, el conjugado puede administrarse durante un periodo de una o dos semanas o más. En aspectos donde se inhibe el crecimiento de células que expresan el receptor de interleucina-3, el crecimiento de las células pueden inhibirse al menos el 50 %, al menos el 65 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85

%, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % en comparación con una muestra de referencia, es decir, una muestra de células no puesta en contacto con un conjugado de la invención.

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

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

Se describe un método para tratar, prevenir y/o controlar una enfermedad o trastorno que presenta o se caracteriza por la expresión del receptor de interleucina-3 que comprende administrar a un ser humano que necesita tal 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 portador 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 modalidad, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser la expresión en exceso de una o más subunidades del receptor de interleucina-3 en células que típicamente expresan el receptor de interleucina-3. En otro aspecto, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser expresión de receptor de interleucina-3 inapropiada en células que típicamente no expresan una o más subunidades del receptor de interleucina-3. Aún en otro aspecto, la enfermedad o trastorno que presenta o se caracteriza por la presencia o presencia en exceso de un tipo de célula que expresa una o más subunidades del receptor de interleucina-3. Las enfermedades o trastornos ilustrativos que pueden tratarse en esta modalidad de la 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 modalidades, la enfermedad o trastorno es SMD.

Se describe, además, un método para tratar, prevenir y/o controlar una enfermedad o trastorno que presenta o se caracteriza por expresión del receptor de interleucina-3 que comprende administrar a un ser humano que necesita tal 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 portador farmacéuticamente aceptable, en donde las células expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta modalidad, las células expresan tanto las subunidades alfa como beta del receptor de interleucina-3. En aspectos específicos de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 20 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 9 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de alrededor de 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. En un aspecto de esta modalidad, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser expresión en exceso de receptor de interleucina-3 sobre células que típicamente expresan el receptor de interleucina-3. En otro aspecto, la expresión del receptor de interleucina-3 puede ser la expresión de receptor de interleucina-3 inapropiada en células que típicamente no expresan el receptor de interleucina-3. Aún en otro aspecto, la enfermedad o trastorno que se muestra o se caracteriza por la presencia o presencia en exceso de un tipo de célula que expresa el receptor de interleucina-3. Las enfermedades o trastornos ilustrativos que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o trastornos alérgicos, enfermedades o trastornos autoinmunitarios, enfermedades o trastornos inflamatorios, o cánceres (incluyendo, 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 modalidades, la enfermedad o trastorno es SMD.

5 Se describe, además, un método para tratar, prevenir y/o controlar el cáncer, cuyo método comprende administrar a un ser humano que necesita tal 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 el cáncer y un portador 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.

10 Se describe un método para tratar o prevenir el cáncer, que comprende administrar a un ser humano que necesita tal tratamiento o prevención una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para tratar o prevenir el cáncer y un portador 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.

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

35 En otros aspectos de estas modalidades, el paciente humano puede estar en un estado de remisión del cáncer. Aún en otros aspectos, el paciente humano ha sido previamente tratado con el conjugado o ha sido previamente tratado con agentes quimioterapéuticos convencionales o tiene radioterapia. Aún en otro aspecto, al paciente humano, en paralelo con el tratamiento con compuestos de la invención, se le puede administrar un agente quimioterapéutico convencional o puede recibir radioterapia. En otros aspectos, el paciente humano no tiene niveles detectables de anticuerpos anti-toxina diftérica antes de la administración de un conjugado de la invención. Aún en 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 refractario o resistente a múltiples fármacos.

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

50 Se describe, además, un método para tratar, prevenir y/o controlar la leucemia mieloide que comprende administrar a un ser humano que necesita tal 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 portador farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado se administra a una dosis superior a 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 refractaria y/o resistente a múltiples fármacos. En ciertos aspectos de esta modalidad, las células de leucemia mieloide pueden expresar tanto las subunidades alfa como beta del receptor de interleucina-3.

60 En aspectos específicos de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 20 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 9 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico

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

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

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

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

Se describe un método para prevenir una recaída de cáncer en un ser humano previamente tratado para el cáncer, que comprende administrar a un ser humano que necesita tal prevención quien había sido previamente tratado para el cáncer, una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída del cáncer y un portador 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 modalidad, método para prevenir una recaída de leucemia mieloide en un ser humano previamente tratado para leucemia mieloide, que comprende administrar a un ser humano que necesita tal prevención que había sido previamente tratado para leucemia mieloide una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída de leucemia mieloide y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que el conjugado se administra a una dosis superior a 4 µg/kg por día.

Aún en otra modalidad, se proporciona un método para prevenir una recaída de cáncer en un ser humano en remisión de tal cáncer, cuyo método que comprende administrar a un ser humano que necesita tal prevención quien está en remisión de dicho cáncer, una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída del cáncer y un portador 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 modalidad se dirige a un método para prevenir una recaída de leucemia mieloide en un ser humano en remisión de la leucemia mieloide, que comprende administrar a un ser humano que necesita tal prevención que está en remisión de leucemia mieloide, una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica eficaz para prevenir la recaída de leucemia mieloide y un portador farmacéuticamente aceptable, en que el conjugado se administra a una dosis superior a 4 µg/kg.

Se describe, además, un método para purgar la médula ósea o la sangre periférica antes del trasplante autólogo de células madre, que comprende poner en contacto *ex vivo* la médula ósea o la sangre periférica obtenida de un ser humano con una composición que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para purgar significativamente la médula ósea o la sangre periférica de células que expresan las subunidades alfa y beta del receptor de interleucina-3. En un aspecto de esta modalidad, la cantidad de médula ósea o células de sangre periférica que expresan una subunidad beta del receptor de interleucina-3 después de poner en

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

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

3.1 Definiciones

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

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

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad", como se usa 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 población de células o células particulares.

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

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

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

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

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

5 Como se usa en la presente descripción, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier molécula, compuesto y/o sustancia que se usa para tratar y/o controlar una enfermedad o trastorno. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, inmunoglobulinas (por ejemplo, Ig multi-específicas, Ig monocatenarias, fragmentos de Ig, anticuerpos policlonales y sus fragmentos, anticuerpos monoclonales y sus fragmentos), péptidos (por ejemplo, receptores de péptido, selectinas), proteínas de unión, productos biológicos, agentes quimioespecíficos, agentes quimiotóxicos (por ejemplo, agentes anticancerígenos), terapia basada en proliferación, radiación, quimioterapia, agentes antiangiogénicos y fármacos de molécula pequeña.

10 Como se usa en la presente descripción, la expresión "terapia basada en proliferación" se refiere a cualquier molécula, compuesto, sustancia y/o método que altere, inhiba o destruya diferencialmente poblaciones de células rápidamente en proliferación (por ejemplo, células cancerosas) en comparación con poblaciones de células que se dividen más lentamente. Las terapias basadas en proliferación pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas terapias quimioterapéuticas y radioterapias que típicamente se usan en oncología. Un agente basado en proliferación puede 15 alterar, inhibir o destruir diferencialmente células rápidamente en proliferación por cualquier mecanismo conocido por un experto en la técnica que incluye, pero no se limita a, alterar la función del ADN (que incluye replicación del ADN), interferir con enzimas implicadas en la reparación de ADN, intercalar el ADN, interferir con la transcripción o traducción del ARN, interferir con enzimas implicadas en la replicación del ADN, interferir con una topoisomerasa, tal como topoisomerasa II, interferir con la mitosis, e inhibir enzimas necesarias para la síntesis de proteínas necesarias para la replicación celular. Ejemplos específicos de terapias basadas en proliferación incluyen, pero no se limitan a, agentes 20 alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos, procarbazona, hidroxiurea, agentes basados en platino, antraciclinas, inhibidores de la topoisomerasa II, venenos del huso e inhibidores mitóticos.

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

30 Como se usa en la presente descripción, la expresión "células cancerosas" se refiere a células que adquieren un conjunto característico de capacidades funcionales durante su desarrollo, que incluye la capacidad de evadir la apoptosis, auto-suficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, invasión/metástasis de tejidos, potencial significativo de crecimiento y/o angiogénesis sostenida. La expresión "célula cancerosa" pretende abarcar tanto las células cancerosas pre-malignas como malignas.

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

40 Como se usa en la presente descripción, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para dar como resultado la prevención del desarrollo, recurrencia o aparición del cáncer y uno o más síntomas de este, para potenciar o mejorar el (los) efecto(s) profiláctico(s) de otra terapia, reducir la gravedad, la duración del cáncer, mejorar uno o más síntomas del cáncer, prevenir el avance del cáncer, producir la regresión del cáncer y/o potenciar o mejorar el (los) efecto(s) terapéutico(s) de otra terapia. En una modalidad, 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 45 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) erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la duración, o tasa, de la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global; (8) un aumento de la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución de la tasa de hospitalizaciones, (10) una disminución de las duraciones de hospitalización, (11) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, preferentemente menos del 2 %, (12) un aumento del número de pacientes en remisión, (13) un aumento de la longitud o duración de la remisión, (14) una disminución de la tasa de recurrencia del cáncer, (15) un aumento del tiempo hasta 50 la recurrencia del cáncer, y (16) una mejora de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida.

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

65

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

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

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

10 Como se usa en la presente descripción, la expresión "paciente humano" se refiere a cualquier ser humano, tanto anciano, adulto, niño como infante.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "refractario" está determinado más frecuentemente por el fracaso para alcanzar el criterio de valoración clínico, por ejemplo, respuesta, duración de respuesta prolongada, supervivencia sin enfermedad prolongada, recaída sin supervivencia, supervivencia sin progresión y supervivencia global. Otra forma de definir que es refractario a una terapia es que un paciente no ha podido lograr una respuesta a una terapia de forma que se determina que la terapia no es terapéuticamente eficaz.

20 Como se usa en la presente descripción, la expresión "se une específicamente a un antígeno" y expresiones análogas se refiere a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos o fragmentos de estos que se unen específicamente a un antígeno o un fragmento y no se unen específicamente a otros antígenos. Un péptido, polipéptido, proteína o anticuerpo que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos, polipéptidos o proteínas con afinidad más baja como se ha determinado, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. Anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a un antígeno pueden ser reactivos de forma cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, 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 afinidad más alta que a cualquier antígeno con reactividad cruzada como se determina mediante el uso de técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Véase, por ejemplo, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology, 2da ed., Raven Press, Nueva York, en las páginas 332-336 para una discusión referente a la especificidad del anticuerpo.

35 Como se usa en la presente descripción, la expresión "en combinación" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere al uso de más de una terapia (por ejemplo, profiláctica y/o terapéutica). El uso de la expresión "en combinación" no limita el orden en el que las terapias (por ejemplo, una primera y segunda terapia) se administran a un sujeto. Una terapia puede administrarse antes de (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con, o posterior a (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas después) de la administración de una segunda terapia a un sujeto que tenía, tiene o es susceptible al cáncer. Las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que las terapias puedan actuar juntas. En una modalidad particular, las terapias se administran a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que proporcionen un aumento del beneficio que si se administraron de otro modo. Cualquier terapia adicional puede administrarse en cualquier orden con la otra terapia adicional.

50 Como se usa en la presente descripción, los términos "controlan", "controlar" 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, mientras que no da como resultado una cura del cáncer. En ciertas modalidades, a un sujeto se le administra una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) para "controlar" el cáncer para prevenir la progresión o empeoramiento de la afección.

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

65 Como se usa en la presente descripción, la expresión "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 célula), moléculas, u otras entidades químicas o biológicas que se encuentran específicamente en o sobre un tejido que se desea para identificar un tejido particular afectado por

una enfermedad o trastorno. En modalidades específicas, el fenotipo de marcador es un fenotipo de superficie celular. De acuerdo con esta modalidad, el fenotipo de superficie celular puede determinarse detectando la expresión de una combinación de antígenos de superficie celular. Los ejemplos no limitantes de fenotipos de superficie celular de las células madre cancerosas de ciertos tipos de tumor incluyen CD34⁺/CD38⁻, CD123⁺, CD44⁺/CD24⁻, CD133⁺, CD34⁺/CD10⁻/CD19⁻, CD138⁻/CD34⁺/CD19⁺, CD133⁺/RC2⁺, CD44⁺/α₂β₁^{hi}/CD133⁺, CLL-1, SLAMs, y otros fenotipos de superficie de célula madre cancerosa mencionados en la presente descripción, además de aquellos que se conocen en la técnica.

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

Como se usa en la presente descripción, los términos "previenen", "prevenir" y "prevención", en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto, se refieren a la prevención o inhibición de la recurrencia, aparición y/o desarrollo de un cáncer o un síntoma de este 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 modalidades, tales 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 de la longitud 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 recaída, sin progresión y/o global del paciente, y (8) una mejora de los síntomas relacionados con el cáncer y/o la calidad de vida. En modalidades específicas, tales términos se refieren a una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas.

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

Como se usa en la presente descripción, la expresión "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 particular, o puede ponerse a disposición un intervalo de referencia estándar para cada ensayo y usarse localmente, regionalmente, nacionalmente, o mundialmente, o puede ser específico de paciente. En una modalidad específica, el término se refiere a un intervalo de referencia para la cantidad de células madre cancerosas en un paciente (por ejemplo, como se ha determinado por obtención de imágenes *in vivo*) o un espécimen de un paciente. En otra modalidad específica, el término se refiere a un intervalo de referencia para la cantidad de células cancerosas en un paciente (por ejemplo, como se describe por obtención de imágenes *in vivo*) o un espécimen de un paciente.

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

Como se usa en la presente descripción, el término "estabilizar" y términos análogos, cuando se usa en el contexto de una población de células madre cancerosas o población de células cancerosas, se refiere 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 de las que está compuesta un cáncer se mantiene, y no aumenta, o aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "régimen terapéuticamente eficaz" se refiere a un régimen para dosificar, cronometrar, la frecuencia y duración de la administración de una o más terapias para el tratamiento y/o control del cáncer o un síntoma de este. En una modalidad específica, el régimen logra uno, dos, tres, o más de los siguientes resultados: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas; (2) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (3) una estabilización o reducción del

5 crecimiento de un tumor o neoplasia; (4) una alteración de la formación de un tumor; (5) erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global, duración, o tasa; (8) un aumento de la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una
 5 disminución de la tasa de hospitalizaciones, (10) una disminución de las duraciones de hospitalización, (11) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, preferentemente menos del 2 %, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión.

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

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

30 Como se usa en la presente descripción, los términos "tratan", "tratamiento" y "tratar" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refieren a la reducción o inhibición de la progresión y/o duración del cáncer, la reducción o mejora de la gravedad del cáncer, y/o la mejora de uno o más síntomas de este, como resultado de la administración de una o más terapias. En modalidades específicas, tales términos se refieren a uno, dos o tres o más resultados tras la administración de uno, dos, tres o más terapias: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre 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 de la formación de un tumor; (5) erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (6) una reducción de la mortalidad; (7) un aumento de la supervivencia sin enfermedad, sin recaída, sin progresión y/o global, duración, o tasa; (8) un aumento de la tasa de respuesta, la durabilidad de la respuesta, o número de pacientes que responden o están en remisión; (9) una disminución de la tasa de hospitalizaciones, (10) una disminución de las duraciones de hospitalización, (11) el tamaño del tumor se mantiene y no aumenta o aumenta menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, preferentemente menos del 4 %, preferentemente menos del 2 %, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión. En ciertas modalidades, tales términos se refieren a una estabilización o reducción de la población de células madre cancerosas. En algunas modalidades, tales términos se refieren a una estabilización o reducción del crecimiento de células cancerosas. En algunas modalidades, tales términos se refieren a una estabilización o reducción de la población de células madre cancerosas y una reducción de la población de células cancerosas. En algunas modalidades, tales términos se refieren a una estabilización o reducción del crecimiento y/o formación de un tumor. En algunas modalidades, tales términos se refieren a la erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional o metastásico (por ejemplo, la minimización o retardo de la diseminación de cáncer). En algunas modalidades, tales términos se refieren a una reducción de la mortalidad y/o un aumento de la tasa de supervivencia de una población de pacientes. En modalidades adicionales, tales 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 modalidades, tales términos se refieren a una disminución de la tasa de hospitalizaciones de una población de pacientes y/o una disminución de la duración de hospitalizaciones para una población de pacientes.
 40
 45
 50

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

4. Breve descripción de las figuras

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

65 Figura 2. Mecanismo de intoxicación de células por DT. Las etapas incluyen (a) unión a célula, (b) endocitosis mediada por receptor, (c) bajo pH, furina y tiorredoxina reductasa, beta-COP y translocación mediada por Hsp90, (d) replegamiento y ribosilación por ADP de EF2, y (e) muerte celular. (Ratts y otros, "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. Cadena principal de carbono alfa mostrada con azul para el dominio catalítico de DT, verde para el dominio de translocación de DT y blanco para IL-3. Modelo basado en las coordenadas de rayos X para DT e IL-3 humana. (Choe y otros, "The crystal structure of diphtheria toxin", Nature 357:216-222 (1992).

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

Figura 5. Gráfico que muestra el porcentaje de pacientes con grado 2 o toxicidades relacionadas con el fármaco más bajas para DT₃₈₈IL-3 en conexión con el Ejemplo 2, abajo.

Figura 6A-B. Gráfico que muestra los niveles en suero de DT₃₈₈IL-3 en el día 1 (A) y día 12 (B) en conexión con el Ejemplo 2, abajo.

Figuras 7A-C. Farmacocinética y respuesta inmunitaria en conexión con el Ejemplo 2, abajo. Figura 7A: C_{máx} (µg/ml) en función de la dosis (µg/kg). Figura 7B: C_{máx} en el día 12 frente a C_{máx} en el día 1, que muestra la relación entre C_{máx} en la primera y última dosis. Figura 7C: DT₃₈₈IL-3 en suero pico (µg/ml) frente al anticuerpo anti-toxina diftérica (anti-DT) en suero pretratamiento (µg/ml), que muestra la relación entre el fármaco pico y los niveles de anticuerpo pretratamiento.

Figura 8A: Una fotomicrografía de pre- y post-aspirado de médula ósea del paciente núm. 19 en conexión con el Ejemplo 2, abajo. Figura 8B: Recuentos de sangre para el paciente núm. 19 en conexión con el Ejemplo 2, abajo. Figura 8C: Una fotomicrografía de pre- y post-aspirado de médula ósea del paciente núm. 36 en conexión con el Ejemplo 2, abajo. Figura 8D: Recuentos de sangre para el paciente núm. 36 en conexión con el Ejemplo 2, abajo.

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención describe una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones.

Se describe un método para inhibir células que expresan el receptor de interleucina-3 que comprende administrar a un ser humano que necesita tal inhibición una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina-3 humana (IL-3)-toxina diftérica eficaz para inhibir dichas células y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde las células expresan la subunidad alfa (en modalidades 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 se caracteriza por células que expresan el receptor de interleucina-3 al administrar a un ser humano que necesita tal tratamiento, prevención y/ control una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3 humana-toxina diftérica eficaz para inhibir dichas células y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde las células expresan la subunidad alfa (en modalidades específicas, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, cáncer, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria y enfermedad alérgica. se describen métodos para purgar la médula ósea o la sangre periférica, poniendo en contacto *ex vivo* la médula ósea o muestra de sangre periférica obtenida de un ser humano con una composición que comprende una cantidad de un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica durante un tiempo suficiente para purgar significativamente la médula ósea o la sangre periférica de células que expresan la subunidad alfa (en modalidades específicas, las subunidades alfa y beta) del receptor de interleucina-3. En consecuencia, se describe además un método para realizar un trasplante de médula ósea autólogo administrando de nuevo al paciente tal médula ósea o sangre periférica purgada, además de composiciones que comprenden tal médula ósea o sangre periférica purgada, opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable.

5.1 Conjugado de interleucina-3-toxina diftérica

En una modalidad, un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica de la presente invención comprende la proteína interleucina-3 (IL-3) madura (que carece del péptido señal) de longitud completa, o una porción, análogo o derivado de esta, que se une al receptor de interleucina-3 o una subunidad de esta sobre una superficie celular, conjugado mediante una tecnología recombinante o mediante enlace químico (covalente) a toxina diftérica, o una porción, análogo o derivado de esta, cuya toxina carece preferentemente del dominio de unión a célula nativo. En una modalidad preferida, IL-3 es IL-3 humana. En ciertas modalidades, el conjugado comprende los dominios catalítico y de translocación de la toxina diftérica fusionados mediante un enlace covalente con IL-3 humana. En otras modalidades, la toxina diftérica está unida a través de un conector peptídico a la porción de IL-3 humana del conjugado. El conector para el conjugado puede ser de dos, tres, cinco, diez o quince aminoácidos de longitud. La longitud del conector puede variar para proporcionar unión óptima del conjugado. En un aspecto preferido, el conector peptídico tiene dos a cuatro aminoácidos de longitud. En un aspecto más específico, el conector peptídico es un conector Met-His. Aunque no se pretende quedar ligado por un mecanismo de acción particular, el conector peptídico flexible facilita el emparejamiento de cadenas y minimiza el posible replegamiento. Las moléculas de conector son comúnmente conocidas en la técnica y se describen

en Denardo y otros, 1998, Clin. Cancer Res. 4:2483-90; Peterson y otros, 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; y Zimmerman y otros, 1999, Nucl. Med. Biol. 26:943-50.

5 Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado y un portador farmacéuticamente aceptable. El conjugado puede comprender cualquier dominio de DT unido a través de cualquier molécula conectora conocida en la técnica a cualquier dominio de IL-3. En una modalidad específica, el conjugado es DT₃₈₈IL-3 (Figura 3), que es una proteína de fusión que comprende los aminoácidos 1-388 fusionados con IL-3 humana madura de longitud completa, a través de un conector de aminoácidos Met-His.

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

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

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

50 Para mejorar o alterar las características de los polipéptidos IL-3, puede emplearse la ingeniería de proteínas. Puede usarse la tecnología de ADN recombinante conocida por los expertos en la técnica para crear proteínas mutantes nuevas o "muteínas", que incluyen sustituciones individuales o múltiples de aminoácidos, deleciones, adiciones, o proteínas de fusión. Tales polipéptidos modificados pueden mostrar, por ejemplo, actividad potenciada, potencia, afinidad y/o elevada estabilidad. Además, éstos pueden purificarse con rendimientos más altos y mostrar mejor solubilidad que el polipéptido natural correspondiente, por ejemplo, bajo ciertas condiciones de purificación y almacenamiento. Por ejemplo, para muchas proteínas, se conoce en la técnica que uno o más aminoácidos pueden ser delecionados del extremo N o extremo C sin pérdida sustancial de función biológica. Un conjugado ilustrativo comprende una IL-3 modificada con sustitución de aminoácidos K116W en la IL-3 humana. Otro conjugado ilustrativo comprende los aminoácidos 125-133 ausentes de IL-3 humana. Ambos de estos conjugados con secuencias de IL-3 mutantes presentan unión potenciada al receptor de IL-3 y presentan mayor citotoxicidad contra células de leucemia (para ejemplos no limitantes de conjugados, véanse Liu y otros "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 y otros "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 y otros "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 y otros "Receptor binding kinetics of human IL-3 variants with altered proliferative activity", Biochem. Biophys. Res. Comm. 288:1244-1249 (2001)).

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

5 5.1.1- Métodos de producción de conjugados de interleucina-3-toxina diftérica

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

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

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

promotor de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) que es activa en astrocitos (Gomes y otros, 1999, Braz. J Med. BioL Res. 32(5):619-631; Morelli y otros, 1999, Gen. Virol. 80:571-83) y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason y otros, 1986, Science 234:1372-1378). En una modalidad específica, la expresión de un conjugado de la invención está regulada por un promotor constitutivo. En otra modalidad, la expresión está regulada por un promotor inducible. En otra modalidad, la expresión está regulada por un promotor específico de tejido.

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

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

Pueden identificarse vectores de expresión que contienen insertos de un gen que codifica un conjugado mediante tres enfoques generales: (a) hibridación de ácidos nucleicos, (b) presencia o ausencia de funciones de gen "marcador", y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de un gen que codifica un conjugado en un vector de expresión puede detectarse por la hibridación de ácidos nucleicos mediante el uso de sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen insertado que codifica el conjugado. En el segundo enfoque, el sistema de vector recombinante/huésped puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de ciertas funciones de gen "marcador" (por ejemplo, actividad de timidina cinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.) producidas por la inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica un conjugado en el vector. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos que codifica el conjugado se inserta dentro de la secuencia del gen marcador del vector, recombinantes que contienen el gen que codifica el inserto de conjugado pueden identificarse por la ausencia de la función de gen marcador. En el tercer enfoque, pueden identificarse vectores de expresión recombinantes ensayando el producto génico (por ejemplo, conjugado) expresado por el recombinante. Tales ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales del conjugado en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, unión a un anticuerpo o el receptor de IL-3.

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

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

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

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

5.2 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

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

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

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

Los materiales usados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para los expertos en la técnica que la dosificación óptima del (de los) ingrediente(s) activo(s) en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de sujeto (por ejemplo, ser humano), la salud general del sujeto, el tipo de cáncer para el que el sujeto necesita tratamiento, el uso de la composición como parte de un régimen de múltiples fármacos, la forma particular del compuesto de la invención, el modo de administración y la composición empleada.

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

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

La composición puede estar destinada a la administración oral, y si es así, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel están incluidas dentro de las formas consideradas en la presente descripción ya sea como sólidas o líquidas.

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

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

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

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

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

Las composiciones de la invención pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de suministro, por ejemplo, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y pueden ser útiles para administrar un compuesto de la invención. En ciertas modalidades, más de un compuesto de la invención se administra a un sujeto. Los métodos de administración pueden incluir, pero no se limitan a, administración por vía oral y administración parenteral; incluyendo la administración parenteral, pero no se limita a, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea; intranasal, epidural, sublingual, intranasal, intracerebral, intraventricular, intratecal, intravaginal, transdérmica, por vía rectal, por inhalación, o por vía tópica a los oídos, nariz, ojos o piel. El modo de

administración preferido se deja a criterio del médico, y dependerá, en parte, del sitio de la afección médica (tal como el sitio de cáncer, un tumor canceroso o una afección precancerosa).

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

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

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

25 Aún en otra modalidad, los compuestos pueden suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, puede usarse una bomba (véanse Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 1987, 14, 201; Buchwald y otros, Surgery 1980, 88: 507; Saudek y otros, N. Engl. J. Med. 1989, 321: 574). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, FL, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York, 1984; Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 1983, 23, 61; véase también Levy y otros, Science 1985, 228, 190; During y otros, Ann. Neurol. 1989, 25, 351; Howard y otros, J. Neurosurg., 1989, 71, 105). En otra modalidad más, puede disponerse un sistema de liberación controlada en proximidad de la diana de los compuestos de la invención, por ejemplo, el cerebro, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por
30 ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, arriba, vol. 2, 1984, pp. 115-138). También pueden usarse otros sistemas de liberación controlada discutidos en la revisión por Langer (Science 1990, 249, 1527-1533).

35 En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de los compuestos de la invención (véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,679,377; la patente de Estados Unidos núm. 5,916,597; la patente de Estados Unidos núm. 5,912,015; la patente de Estados Unidos núm. 5,989,463; la patente de Estados Unidos núm. 5,128,326; publicación PCT núm. WO 99/15154; y publicación PCT núm. WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en las formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicolidas (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA) y poliolefinas. En una modalidad preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable durante el almacenamiento, estéril y biodegradable.

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

45 Las presentes composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizadores, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. En una modalidad, el portador farmacéuticamente aceptable es una cápsula (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,698,155). Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences por E.W. Martin.

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

65

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

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

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

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante el uso de metodología muy conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición destinada a administrarse mediante inyección puede prepararse combinando un compuesto de la invención con agua para formar una disolución. Un tensioactivo puede añadirse para facilitar la formación de una disolución o suspensión homogénea. Los tensioactivos son complejos que pueden

interactuar no covalentemente con un compuesto de la invención para facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto de la invención en el sistema de suministro acuoso.

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

5.3 Usos terapéuticos y profilácticos de conjugados de fusión de interleucina-3-toxina diftérica

10 Se describen los métodos para inhibir células que expresan el receptor de IL-3 en un ser humano que lo necesita administrando una cantidad eficaz de un conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica de la invención. En ciertas modalidades, las células que expresan el receptor de IL-3 no son células de leucemia mieloide. En algunas modalidades, las células expresan la subunidad alfa del receptor de interleucina-3. En otras modalidades, las células expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3. Aún en otras modalidades, las células expresan tanto las subunidades alfa como beta del receptor de IL-3.

15 Se describen terapias que implican administrar uno o más de los conjugados de interleucina-3-toxina diftérica de la invención y composiciones que comprenden los conjugados de interleucina-3-toxina diftérica a un sujeto, preferentemente un sujeto humano, para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar la enfermedad o trastorno que presenta o se caracteriza por la expresión del receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de esta. En una modalidad el método de prevenir, tratar, controlar y/o mejorar una enfermedad o trastorno que presenta o se caracteriza por la expresión del receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de esta, dicho método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de uno o más los conjugados de interleucina-3-toxina diftérica de la invención. Tales enfermedades y trastornos incluyen cáncer, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias.

25 Se describen además los métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita un conjugado de interleucina-3-toxina diftérica de la invención y una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintas del conjugado de interleucina-3-toxina diftérica de la invención que se usan actualmente, se han usado, son conocidas por ser útiles, o pueden ser útiles en la prevención, tratamiento, control y/o mejora de una enfermedad o trastorno que presenta o se caracteriza por la expresión del receptor de interleucina-3 o uno o más síntomas de esta. Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente. En una modalidad específica, las terapias de combinación comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de la invención y una cantidad eficaz de al menos otra terapia que tiene el mismo mecanismo de acción que dicho conjugado. En una modalidad específica, las terapias de combinación comprenden una cantidad eficaz de un conjugado de la invención y una cantidad eficaz de al menos otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente que dicho conjugado. En ciertas modalidades, las terapias de combinación mejoran el efecto profiláctico o terapéutico de un conjugado de la invención funcionando junto con el conjugado para tener un efecto aditivo o sinérgico. En ciertas modalidades, las terapias de combinación reducen los efectos secundarios asociados a los agentes profilácticos o terapéuticos. En otras modalidades, las terapias de combinación se administran antes, durante o después de la administración de las composiciones de la invención.

40 El cáncer o la enfermedad neoplásica, que incluye, pero no se limita a, neoplasias, tumores, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por crecimiento celular no controlado, puede tratarse, suprimirse, retardarse, controlarse, inhibirse o prevenirse administrando a un sujeto que lo necesita un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un compuesto de la invención. Se describe el tratamiento, supresión, retardo, control, inhibición del crecimiento y/o progresión, y prevención del cáncer o enfermedad neoplásica como se describe en la presente descripción.

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

50 Se describe un método para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el método que comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en donde el paciente ha sido diagnosticado con cáncer.

55 Un aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el método que comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en donde el paciente presenta recaída del cáncer.

60 Un aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el método que comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en donde la terapia ha fracasado o está fracasando en el paciente.

65

Un aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el método que comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en donde el paciente está en remisión de cáncer.

5

Un aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el método que comprende administrar al paciente un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención, en donde el paciente es refractario a la terapia.

10

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

15

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

20

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

25

30

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

35

40

45

Se describe un método para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer, el método que comprende administrar a un paciente que lo necesita un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención, en donde el paciente recibió otra terapia. En algunas modalidades, la terapia previa es, por ejemplo, quimioterapia, terapia de moléculas pequeñas, radioinmunoterapia, terapia con toxinas, terapia con enzimas activantes de profármacos, terapia biológica, terapia con anticuerpos, terapia quirúrgica, terapia con hormonas, inmunoterapia, terapia antiangiogénica, terapia dirigida, terapia epigenética, terapia de desmetilación, terapia con inhibidores de histona desacetilasa, terapia de diferenciación, radioterapia, o cualquier combinación de estas.

50

55

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

60

65

Otro aspecto se refiere a un método para prevenir el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el método que comprende administrar a un paciente que lo necesita un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención, en donde el cáncer en el paciente ha entrado en remisión. En algunas modalidades de este aspecto, mediante la administración de

un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el profesional médico puede curar eficazmente el cáncer, o prevenir su reaparición.

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

Otro aspecto se refiere a un método para prevenir, tratar, y/o controlar el cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), el método que comprende administrar a un paciente que lo necesita un régimen profilácticamente eficaz o un régimen terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente un conjugado de la invención, en donde el conjugado se administra a una dosis que es inferior a la dosis equivalente en humanos (HED) del nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) durante un periodo de tres meses, cuatro meses, seis meses, nueve meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, o más. El NOAEL, como se determina en estudios en animales, es útil en la determinación de la dosis inicial recomendada máxima para ensayos clínicos en humanos. Por ejemplo, los NOAEL pueden extrapolarse para determinar dosis equivalentes en humanos. Típicamente, tales extrapolaciones entre especies se realizan basándose en las dosis que se normalizaron al área superficial del cuerpo (es decir, mg/m²). En modalidades específicas, los NOAEL se determinan en ratones, hámsteres, ratas, hurones, cobayas, conejos, perros, primates (monos, titis, monos ardilla, babuinos), microcerdos, o minicerdos. Para una discusión sobre el uso de NOAEL y su extrapolación para determinar dosis equivalentes en seres humanos, véase Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Pharmacology and Toxicology, julio de 2005.

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

En ciertas modalidades de estos aspectos, los regímenes comprenden administrar un régimen profilácticamente eficaz y/o un régimen terapéuticamente eficaz, en donde el régimen da como resultado una reducción de la población de células madre cancerosas en el paciente. En una modalidad, el paciente que recibe el régimen se monitoriza para determinar si el régimen ha dado como resultado una reducción de la población de células madre cancerosas en el paciente.

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

En algunas modalidades, 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 de unidad en el caso de un análisis histológico). En ciertas modalidades, la cantidad de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre, como un subconjunto de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre, o como un subconjunto de un subconjunto de las células cancerosas presentes en el espécimen de sangre. La cantidad de células madre cancerosas, en otras modalidades, puede determinarse como un porcentaje de las células sanguíneas totales.

En otras modalidades, el espécimen extraído del paciente es un espécimen de tejido (por ejemplo, una biopsia extraída de supuesto tejido canceroso), donde la cantidad de células madre cancerosas puede medirse, por ejemplo, basándose en la cantidad de células madre cancerosas por unidad de peso del tejido. En ciertas modalidades, 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 puede compararse con la cantidad de células madre cancerosas medidas en muestras de referencia para evaluar la eficacia del régimen, y la mejora del cáncer en terapia. En una modalidad, la muestra de referencia es un espécimen extraído del paciente que recibe la terapia, en donde el espécimen se extrae del paciente en un momento de tiempo temprano (por ejemplo, antes de recibir el régimen, como una muestra de referencia del nivel inicial, o en un momento de tiempo temprano mientras recibe la terapia). En otra modalidad, la muestra de referencia se extrae de un paciente sano no afectado por el cáncer.

En otras modalidades, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen extraído puede compararse con un intervalo de referencia predeterminado. En una modalidad específica, el intervalo de referencia predeterminado se basa

en i) la cantidad de células madre cancerosas obtenidas de una(s) población(poblaciones) de pacientes que padecen el mismo tipo de cáncer que el paciente que recibe la terapia, o ii) la cantidad de células madre obtenidas de una población (poblaciones) de pacientes sin cáncer.

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

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

20 En otras modalidades, los regímenes comprenden administrar un régimen profilácticamente eficaz y/o un régimen terapéuticamente eficaz, en donde el régimen da como resultado una reducción de la cantidad de células cancerosas en el paciente. En una modalidad, el paciente que recibe el régimen se monitoriza para determinar si el régimen ha producido una reducción de la cantidad de células cancerosas en el paciente.

25 Típicamente, la monitorización de la cantidad de células cancerosas se realiza detectando la cantidad de células cancerosas en un espécimen extraído del paciente. Métodos de detección de la cantidad de células cancerosas en un espécimen se describen abajo en la Sección 5.5. Esta etapa de monitorización típicamente se realiza al menos a los 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, o 30, 60, 90, 120 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, o >12 meses después de que el paciente empiece a recibir el régimen.

30 En algunas modalidades, 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 de unidad en el caso de un análisis histológico). La población de células cancerosas, en ciertas modalidades, puede determinarse como un porcentaje de los glóbulos sanguíneos totales.

35 En algunas modalidades, 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 de unidad en el caso de un análisis histológico). La población de células cancerosas, en ciertas modalidades, puede determinarse como un porcentaje de las células de médula ósea totales.

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

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

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

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

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

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

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

5.3.1 Dosificación y frecuencia de administración

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

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

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

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

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

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

En algunas modalidades, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos comprenden administrar dosificaciones de un conjugado o composición farmacéutica de la invención que son eficaces para reducir la población de células

cancerosas. Métodos que pueden usarse para determinar la población de células cancerosas en un paciente que recibe tratamiento se tratan abajo en la Sección 5.5.

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

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

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

25 En el tratamiento de ciertos pacientes humanos que tienen tumores sólidos, extraer múltiples especímenes de tejido de un supuesto sitio tumoral puede o puede no demostrar ser imposible. En estas modalidades, la dosificación de los compuestos de la invención en el régimen profiláctico y/o terapéutico para un paciente humano se extrapola de la dosis en modelos animales que son eficaces para reducir la cantidad de células madre cancerosas en aquellos modelos animales. En los modelos animales, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos se ajustan para lograr una reducción en la cantidad de células madre cancerosas encontrada en un espécimen de prueba extraído de un animal después de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico, en comparación con una muestra de referencia. La muestra de referencia puede ser un espécimen extraído del mismo animal, antes de recibir el régimen profiláctico y/o terapéutico. En modalidades específicas, la cantidad de células madre cancerosas en el espécimen de prueba es al menos del 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, o 60 % más baja que en la muestra de referencia. Las dosis eficaces en reducir la cantidad de células madre cancerosas en los animales pueden normalizarse al área superficial del cuerpo (mg/m²) para proporcionar una dosis equivalente en humanos.

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

40 En una modalidad, los regímenes profilácticos y/o terapéuticos comprenden la administración de un conjugado de la invención o composiciones farmacéuticas de este en múltiples dosis. Cuando se administran en múltiples dosis, el conjugado o composiciones farmacéuticas se administran con una frecuencia y en una cantidad suficiente para prevenir, tratar y/o controlar la afección. En una modalidad, la frecuencia de administración oscila de una vez al día hasta alrededor de una vez cada ocho semanas. En otra modalidad, la frecuencia de administración oscila de alrededor de una vez a la semana hasta alrededor de una vez cada seis semanas. En otra modalidad, la frecuencia de administración oscila de alrededor de una vez cada tres semanas hasta alrededor de una vez cada cuatro semanas. En ciertas modalidades, el conjugado se administra durante un periodo de una semana a dos años. En otra modalidad más, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a un año. En modalidades adicionales, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a seis meses. En algunas modalidades, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a doce semanas. Aún en otras modalidades, el conjugado se administra durante un periodo de dos semanas a seis semanas. En ciertas modalidades, 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 modalidades preferidas, el conjugado se administra al menos tres veces a la semana. En otras modalidades preferidas, el compuesto se administra diariamente durante cinco días consecutivos, o diariamente durante siete días consecutivos. En otras modalidades, 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 modalidades preferidas, el conjugado se administra tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas. En algunas modalidades, cada vez que el conjugado se administra, se administra a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En algunas modalidades, el compuesto se administra durante, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince ciclos.

65 En aspectos específicos de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 20 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de

alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 9 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de alrededor de 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. En modalidades específicas, donde la enfermedad o trastorno es leucemia mieloide, la dosificación dada está en un intervalo de entre superior a 4 µg/kg por día a alrededor de 20 µg/kg por día. Las dosificaciones por día descritas en la presente descripción pueden administrarse en días consecutivos y/o no consecutivos. En una modalidad específica, se administra una dosificación por día en días no consecutivos durante una semana, por ejemplo, lunes, miércoles y viernes. En otra modalidad específica, se administra una dosificación por día en días consecutivos durante una semana, por ejemplo, lunes, martes, miércoles, jueves y viernes.

En aspectos específicos de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de 4 µg/kg por día o mayor. En otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 20 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 9 µg/kg por día. Aún en otros aspectos, el conjugado puede administrarse a una dosis en un intervalo de alrededor de 4 µg/kg por día a alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico de esta modalidad, el conjugado puede administrarse a una dosis de alrededor de 5,3 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 7,1 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 9,4 µg/kg por día, o a una dosis de alrededor de 12,5 µg/kg por día. En un aspecto específico, el conjugado puede administrarse a o por debajo de una dosis que es la máxima dosis tolerada sin excesiva toxicidad. En modalidades específicas, donde la enfermedad o trastorno es leucemia mieloide, la dosificación dada está en un intervalo de entre superior a 4 µg/kg y alrededor de 20 µg/kg.

En otra modalidad, cuando la enfermedad es síndrome mielodisplásico, la dosificación dada es al menos 4 µg/kg o mayor.

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

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

En ciertas modalidades, la dosificación de un conjugado de la invención se administra como una infusión intravenosa durante alrededor de 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 dosificación de un conjugado de la invención administrada a un sujeto para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer está en el intervalo de 0,01 a 500 µg/kg, y más típicamente, en el intervalo de 0,1 µg/kg a 100 µg/kg, del peso corporal del sujeto. En una modalidad, la dosificación administrada a un sujeto está en el intervalo de 0,1 µg/kg a 50 µg/kg, o 1 µg/kg a 50 µg/kg, del peso corporal del sujeto, con mayor preferencia 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 modalidad preferida, la dosificación de conjugado de la invención administrada a un sujeto es 4 µg/kg, 5,32 µg/kg, 7,07 µg/kg, 9,4 µg/kg, o 12,5 µg/kg, del peso corporal del paciente.

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

En una modalidad preferida, la dosificación de conjugado de la invención administrada a un sujeto para tratar, prevenir y/o controlar 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 modalidad, el conjugado de la invención se administra cada día durante cinco días. En otras modalidades, la dosificación puede repetirse durante múltiples ciclos, en las que el número de ciclos elegido puede o puede no tener en cuenta la medición de anticuerpos anti-DT en el paciente.

En otra modalidad específica, la dosificación de un conjugado de la invención administrada 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.

5 En una modalidad específica, la dosificación de un conjugado de la invención administrada 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 típicamente, en el intervalo de 0,1 g/m² a 7,5 g/m², del área superficial del cuerpo del sujeto. En una modalidad, la dosificación 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 del área superficial del cuerpo del sujeto.

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

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

20 En otra modalidad, se describen regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces en los que una cantidad de conjugado de DT-IL3 se administra a un paciente para lograr niveles en plasma 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.

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

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

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

40 En algunas modalidades, el título de anticuerpos anti-DT en un paciente se mide antes de la administración de un conjugado de la invención. El título de anticuerpos anti-DT pretratamiento puede considerarse en la determinación de la elegibilidad de un paciente para recibir un conjugado de la invención, o el régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz administrado al paciente. Por ejemplo, un título de anticuerpos anti-DT del paciente puede

sugerir la administración de un conjugado de la invención a una dosificación particular, a una frecuencia particular y/o durante un cierto periodo de tiempo.

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

15 El conjugado de la invención y el uno o más terapéuticos contra el cáncer adicionales pueden administrarse por separado, simultáneamente, o secuencialmente. En diversas modalidades, el compuesto de la invención y el producto terapéutico contra el cáncer adicional se administran separados menos de 5 minutos, separados menos de 30 minutos, separados menos de 1 hora, separados alrededor de 1 hora, separados alrededor de 1 a alrededor de 2 horas, separados alrededor de 2 horas a alrededor de 3 horas, separados alrededor de 3 horas a alrededor de 4 horas, separados alrededor de 4 horas a alrededor de 5 horas, separados alrededor de 5 horas a alrededor de 6 horas, separados alrededor de 6 horas a alrededor de 7 horas, separados alrededor de 7 horas a alrededor de 8 horas,
20 separados alrededor de 8 horas a alrededor de 9 horas, separados alrededor de 9 horas a alrededor de 10 horas, separados alrededor de 10 horas a alrededor de 11 horas, separados alrededor de 11 horas a alrededor de 12 horas, separados alrededor de 12 horas a 18 horas, separados 18 horas a 24 horas, separados 24 horas a 36 horas, separados 36 horas a 48 horas, separados 48 horas a 52 horas, separados 52 horas a 60 horas, separados 60 horas a 72 horas, separados 72 horas a 84 horas, separados 84 horas a 96 horas, o separados 96 horas a 120 horas. En modalidades preferidas, dos o más productos terapéuticos contra el cáncer se administran dentro de la misma visita del
25 paciente.

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

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

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

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

a 6 horas, separados 6 horas a 7 horas, separados 7 horas a 8 horas, separados 8 horas a 9 horas, separados 9 horas a 10 horas, separados 10 horas a 11 horas, separados 11 horas a 12 horas, separados no más de 24 horas, o separados no más de 48 horas. En una modalidad, los productos terapéuticos contra el cáncer se administran dentro de esta visita a la consulta. En otra modalidad, los productos terapéuticos contra el cáncer de combinación se administran separados de 1 minuto a 24 horas.

5.3.2 Tipos de enfermedades y trastornos

Se describen los métodos para tratar o prevenir o controlar una enfermedad o trastorno caracterizado por células que expresan la subunidad beta del receptor de IL-3 en seres humanos, administrando a seres humanos que necesita tal tratamiento o prevención, una composición farmacéutica que comprende una cantidad de conjugado de IL-3-toxina diftérica de la invención eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno. En ciertas modalidades, la enfermedad o trastorno no es un cáncer hematológico. En otras modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno alérgico. En otras modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio. En otra modalidad, la enfermedad o trastorno es uno caracterizado por afectar las células dendríticas plasmocitoides (por ejemplo, cánceres de células dendríticas tales como leucemia blástica de NK y neoplasia dermatológica de CD4⁺CD56⁺). En ciertas modalidades, los sujetos tienen leucemia mielógena aguda (LMA). En ciertas otras modalidades, los sujetos tienen síndrome mielodisplásico (SMD). En otras modalidades, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), LMC, LLA, leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.

Se describen los métodos para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar un trastorno inflamatorio o uno o más síntomas de este como una alternativa a otras terapias convencionales. En modalidades específicas, el paciente al que se le controla la enfermedad o se trata de acuerdo con los métodos descritos es refractario a otras terapias o es susceptible a reacciones adversas de tales terapias. El paciente puede ser una persona con un sistema inmunitario deprimido (por ejemplo, pacientes en estado posoperatorio, pacientes en quimioterapia y pacientes con enfermedad de inmunodeficiencia, pacientes con displasia broncopulmonar, pacientes con enfermedad cardíaca congénita, pacientes con fibrosis quística, pacientes con enfermedad cardíaca adquirida o congénita, y pacientes que padecen una infección), una persona con función renal o hepática alterada, ancianos, niños, infantes, infantes nacidos prematuramente, personas con trastornos neuropsiquiátricos o aquellos que toman fármacos psicotrópicos, personas con historias de convulsiones, o personas en medicación que interaccionaría negativamente con los agentes convencionales usados para prevenir, controlar, tratar o mejorar una infección respiratoria viral o uno o más síntomas de esta.

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

Trastornos autoinmunitarios

Se describe un método para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar un trastorno autoinmunitario o uno o más síntomas de este, dicho método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis de una cantidad eficaz de una o más composiciones farmacéuticas de la invención, en donde las células implicadas en tales trastornos expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3. En los trastornos autoinmunitarios, el sistema inmunitario desencadena una respuesta inmunitaria y el sistema inmunitario del cuerpo normalmente protector produce daño a sus propios tejidos auto atacándolos accidentalmente. Existen muchos trastornos autoinmunitarios diferentes que afectan el cuerpo en diferentes formas. Por ejemplo, el cerebro se afecta en individuos con esclerosis múltiple, el intestino se afecta en individuos con enfermedad de Crohn, y el sinovio, hueso y cartílago de diversas articulaciones se afectan en individuos con artritis reumatoide. A medida que avanzan los trastornos autoinmunitarios, pueden dar como resultado la destrucción de uno o más tipos de tejidos del cuerpo, crecimiento anormal de un órgano, o cambios en la función del órgano. El trastorno autoinmunitario puede afectar solo un órgano o tipo de tejido o puede afectar múltiples órganos y tejidos. Los órganos y tejidos comúnmente afectados por los trastornos autoinmunitarios incluyen glóbulos rojos, vasos sanguíneos, tejidos conjuntivos, glándulas endocrinas (por ejemplo, la tiroides o páncreas), músculos, articulaciones y piel.

Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden ser prevenidos, tratados, controlados y/o mejorados por los métodos descritos incluyen, pero no se limitan a, resistencia a fármacos adrenérgicos, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, encefalomielititis alérgica, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria, trombocitopenia neonatal autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ooforitis y orquitis autoinmunitarias, trombocitopenia autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide bulloso, cardiomiopatía, síndrome de cardiotomía, celiacía-dermatitis, hepatitis activa crónica, síndrome de fatiga crónica-disfunción inmunitaria (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutininas frías, enfermedad de Crohn, enfermedad de depósitos densos, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis (por ejemplo, nefropatía por IgA), enteropatía sensible al gluten, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, hipertiroidismo (es decir, tiroiditis de Hashimoto), fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de Addison idiopática,

púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), neuropatía por IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, miocarditis, diabetes mellitus de tipo 1 o mediada por inmunidad, neuritis, otro fallo de las glándulas endocrinas, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, poliendocrinopatías, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, post-IM, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, policondritis recidivante, síndrome de Reiter, enfermedad cardíaca reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, urticaria, uveítis, oftalmia por uveítis, vasculitis tales como dermatitis herpetiforme-vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

Alergias

Se describe un método para prevenir, tratar, controlar y/o mejorar una o más enfermedades alérgicas o alergias o uno o más síntomas de estas, en donde las células implicadas en tales enfermedades o alergias expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, dicho método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una dosis de una cantidad eficaz de una o más composiciones farmacéuticas de la invención. Las reacciones alérgicas mediadas por inmunidad (hipersensibilidad) se clasifican en cuatro tipos (I-IV) de acuerdo con los mecanismos subyacentes que conducen a la manifestación de los síntomas alérgicos. Las reacciones alérgicas de tipo I son reacciones de hipersensibilidad inmediatas caracterizadas por la liberación mediada por IgE de sustancias vasoactivas tales como histamina de mastocitos y basófilos. Durante horas, los mastocitos y basófilos liberan citocinas proinflamatorias que producen la vasodilatación, elevada permeabilidad capilar, hipersecreción glandular, espasmo de músculo liso e infiltración de tejido con eosinófilos y otras células inflamatorias.

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

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

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

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

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

Cáncer

Cualquier tipo de cáncer en el que las células madre cancerosas o células cancerosas expresen las subunidades beta y/o alfa del receptor de interleucina-3 puede ser prevenido, tratado y/o controlado. Los ejemplos no limitantes de cánceres que pueden ser prevenidos, tratados y/o incluyen: leucemias, tales como, pero no se limitan a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y eritroleucemia y síndrome mielodisplásico; leucemias crónicas, tales como, pero no se limitan a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia verdadera; linfomas tales como, pero no se limitan a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero no se limitan a, mieloma múltiple ardiente, mieloma no secretor, mieloma osteoesclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenström; gammapatía monoclonal de significancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de las cadenas pesadas; cáncer de células dendríticas, que incluye cáncer de células dendríticas plasmocitoides, linfoma blástico de NK (también conocido como linfoma cutáneo de NK/linfocitos T y neoplasias dermatológicas agranulares (CD4+/CD56+)); leucemia basófila; sarcomas de hueso y tejido conjuntivo tales como, pero no se limitan a, sarcoma de huesos, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma del periostio, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no de la glía, neurinoma acústico, craneofaringioma,

meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero no se limita a, carcinoma ductal, adenocarcinoma, carcinoma lobular (de células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarenal tal como, pero no se limita a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero no se limita a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático tal como, pero no se limita a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres pituitarios tales como, pero limitados a, enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares tales como, pero no se limitan a, melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroideo y melanoma de cuerpos ciliares, y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres de cuello uterino tales como pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como, pero no se limitan a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como, pero no se limitan a, carcinoma epitelial de ovario, tumor limítrofe, tumor de células germinativas y tumor de estroma; cánceres de esófago tales como, pero no se limitan a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células en avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como, pero no se limitan a, adenocarcinoma, fungante (polipoide), ulcerado, de diseminación superficial, de diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado tales como, pero no se limitan a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de la vesícula biliar tales como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como, pero no se limitan a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares tales como, pero no se limitan a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma por teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata tales como, pero no se limitan a, neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rhabdomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres de boca tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de las glándulas salivales tales como, pero no se limitan a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide quístico; cánceres de faringe tales como, pero no se limitan a, cáncer de células escamosas, y verrugoso; cánceres de piel tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno por lentigo, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/ o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como, pero no se limitan a, carcinoma de células transitorias, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de tales trastornos, véase Fishman y otros, 1985, Medicine, 2da Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy y otros, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., Estados Unidos de América).

Los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces también son útiles en el tratamiento, prevención y/o control de una variedad de cánceres u otras enfermedades proliferativas anormales en donde las células de tales enfermedades expresan la subunidad beta del receptor de interleucina-3, que incluyen (pero no se limitan a) los siguientes: carcinoma, que incluye el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides y piel; que incluye carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfocítico, que incluyen leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Burkitt; tumores hematopoyéticos de linaje mielocítico, que incluyen leucemias mielógenas agudas y crónicas y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimatoso, que incluyen fibrosarcoma y rhabdomiosarcoma; 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, rhabdomiosarcoma y osteosarcoma; y otros tumores, que incluyen melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma. En algunas modalidades, los cánceres asociados a aberraciones en la apoptosis se previenen, tratan y/o controlan.

Tales cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones p53, tumores dependientes de hormonas de la mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar, y síndromes mielodisplásicos. En modalidades específicas, el tumor maligno o cambios desproliferativos (tales como metaplasias y displasias), o trastornos hiperproliferativos de la piel, pulmón, hígado, hueso, cerebro, estómago, colon, mama, próstata, vejiga, riñón, páncreas, ovario y/o útero se previenen, tratan y/o gestionan de acuerdo con los métodos. En otras modalidades específicas, se previene, trata y/o gestiona un sarcoma, melanoma o leucemia de acuerdo con los métodos descritos. En ciertas modalidades, los sujetos tienen leucemia mielógena aguda (LMA). En ciertas otras modalidades, los sujetos tienen síndrome mielodisplásico (SMD). En otras modalidades, los sujetos tienen leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). En otras modalidades específicas, el síndrome mielodisplásico se previene, trata y/o controla.

5.3.3 Poblaciones de pacientes diana

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

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran a sujetos que desarrollan, desarrollaron o se espera que desarrollen (por ejemplo, sujetos con una predisposición genética para un tipo particular de cáncer, sujetos que han sido expuestos a un carcinógeno, sujetos con cáncer recientemente diagnosticado, sujetos que han fracasado en el tratamiento para cáncer, sujetos que han recaído del cáncer, o sujetos que están en remisión de un cáncer particular). Tales sujetos pueden o pueden no haber sido previamente tratados para el cáncer o pueden estar en remisión, recaída, o pueden haber fracasado al tratamiento. Tales pacientes pueden también tener citogenética anormal. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse como cualquier línea de terapia del cáncer, por ejemplo, una primera línea, segunda línea, o tercera línea de terapia del cáncer. En una modalidad específica, el sujeto que va a recibir o que recibe una composición farmacéutica de la invención está recibiendo o ha recibido otras terapias para el cáncer. En otra modalidad, el sujeto que va a recibir una composición farmacéutica de la invención está recibiendo otras terapias para el cáncer y las composiciones farmacéuticas de la invención se administran al sujeto antes de que se produzca cualquier efecto adverso o intolerancia de estas otras terapias para el cáncer. En una modalidad alternativa, el sujeto que va a recibir o que recibe una composición farmacéutica de la invención no ha recibido o no está recibiendo otras terapias para el cáncer.

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

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

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

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

65

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

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

15 En ciertas modalidades, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto refractario a una o más terapias. En una modalidad, que un cáncer es refractario a una terapia significa que al menos alguna porción significativa de las células cancerosas no se destruye o su división celular no se detiene. La determinación de si las células cancerosas son refractarias puede hacerse ya sea *in vivo* o *in vitro* por cualquier método conocido en la técnica para evaluar la eficacia de una terapia en células cancerosas, mediante el uso de los significados aceptados en la técnica de "refractario" en un contexto tal. En diversas modalidades, un cáncer es refractario cuando la cantidad de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o ha aumentado. En otras modalidades, que un cáncer es refractario significa que al menos alguna porción significativa de las células madre cancerosas no se han destruido o detenido su división celular. La determinación de si las células madre cancerosas son refractarias puede hacerse ya sea *in vivo* o *in vitro* por cualquier método conocido en la técnica o descrito en la presente descripción.

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

30 En algunas modalidades, una composición farmacéutica se administra 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 modalidades, un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz se administra 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 modalidad más específica, el régimen produce un recuento de linfocitos absoluto medio de al menos aproximadamente 400 células/mm³.

45 En algunas modalidades, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto que está en remisión. En una modalidad específica, el sujeto no tiene cáncer detectable, es decir, ningún cáncer es detectable mediante el uso de un método convencional descrito en la presente descripción (por ejemplo, IRM) o conocido por un experto en la técnica. En otra modalidad, una composición farmacéutica de la invención se administra a un paciente que no tiene una respuesta inmunitaria detectable a toxina diftérica. En una modalidad preferida, la respuesta inmunitaria se detecta mediante ELISA.

50 5.3.4 Terapias de combinación

Se describen los métodos para prevenir, tratar y/o controlar el cáncer, los métodos que comprenden administrar a un paciente (por ejemplo, un paciente humano) que lo necesita un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz, el régimen que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la invención y una o más terapias adicionales, donde dicha terapia adicional no es un conjugado de la invención. En una modalidad específica, las terapias de combinación descritas comprenden una composición farmacéutica de acuerdo con la invención y al menos otra terapia que tiene el mismo mecanismo de acción que dicho conjugado. En otra modalidad específica, las terapias de combinación comprenden una composición farmacéutica identificada de acuerdo con los métodos descritos y al menos otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) que tiene un mecanismo de acción diferente que dicho conjugado. La composición farmacéutica de la invención y la terapia adicional pueden administrarse por separado, simultáneamente, o secuencialmente. La combinación de agentes puede actuar aditivamente o sinérgicamente. Las terapias de combinación de la presente invención reducen los efectos secundarios asociados a las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos).

65

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

5 Cualquier terapia (por ejemplo, agente terapéutico o profiláctico) que sea útil, se ha usado, o se usa actualmente para la prevención, tratamiento y/o control del cáncer puede usarse 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 ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Los ejemplos no limitantes de terapias para el cáncer incluyen quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía, terapia de moléculas pequeñas, terapia antiangiogénica, terapia de diferenciación, terapia epigenética, radioinmunoterapia, terapia dirigida y/o terapia biológica que incluye inmunoterapia. En ciertas modalidades, un régimen profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz comprende la administración de una combinación de terapias.

15 Los ejemplos de terapias para el cáncer incluyen, pero no se limitan a: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antraciclina; antramina; asparaginasa; asperlina; azacitidina (Vidaza); azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bisfosfonatos (por ejemplo, pamidronato (Aredria), clodronato de sodio (Bonefos), ácido zoledrónico (Zometa), alendronato (Fosamax), etidronato, ibandronato, cimadronato, risedromato y tiludromato); bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sodio; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina (Ara-C); dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorubicina; decitabina (Dacogen); agentes de desmetilación, dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziacuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; inhibidores de EphA2; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; inhibidores de histona desacetilasa (HDACs); clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; mesilato de imatinib (Gleevec, Glivec); interleucina II (incluyendo interleucina II recombinante, o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-I a; interferón gamma-I b; 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 núm. WO 02/098370, que se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad)); acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogarilo; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedpa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxaliplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; pipsulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfimer sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromicina; clorhidrato de puromicina; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfin; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporetida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina.

Otros ejemplos de terapias para el cáncer incluyen, pero no se limitan a: 20-epi-1,25-dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarubicina; acilfulveno; adicipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética anti-dorsalizante; antiandrógeno, carcinoma prostático; antiestrógeno; antineoplastona; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicutina; moduladores de los genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosoporina; derivados de beta-lactama; beta-aletina; beta-clamicina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilspermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; IL-2 del virus de la viruela del canario; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartilago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinaxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de

criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamilo; diacicuona; didemina B; didox; dietilnoespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, dioxamicina; difenilespiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; episterida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; lanreotina; fotemustina; texafirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; inhibidores de la HMG CoA reductasa (por ejemplo, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lescol, lupitor, lovastatina, rosuvastatina y simvastatina); hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor de los receptores del factor de crecimiento 1 similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol, 4-iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuprorelina; levamisol; LFA-3TIP (Biogen, Cambridge, MA; publicación internacional núm. WO 93/0686 y patente de Estados Unidos núm. 6.162.432); liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; texafirina de lutecio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinas de matriz; menogarilo; merbarona; meterilina; metioninas; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario de emparejamiento incorrecto; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A+estreptocinasas de pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor de los genes de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en multisupresor tumoral 1; antineoplásico de mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; oquicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palaumina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; paceliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosán sódico; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida, alcohol perilífico; fenacinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor de los activadores del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfimer sódico; porfiriomicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune basado en proteína A; inhibidor de proteína cinasa C; inhibidores de proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno y hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcofitol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión a antígenos monocatenaria; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico, solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicarnicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiastina 1; escualamina; inhibidor de citoblastos; inhibidores de la división de citoblastos; estipiamicina; inhibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista de los péptidos intestinales vasoactivos superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; 5-fluorouracilo; leucovorina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalan sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temporfinina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista de receptores de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de la tiroides; etiopurpurina de etilo de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de citoblastos totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterida; inhibidores de tirosina cinasas; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital, antagonistas de receptores de urocina; vapreotida; variolina B; sistema vectorial, terapia génica de eritrocitos; talidomida; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; VITAXIN™ (véase la publicación de patente de Estados Unidos núm. US 2002/0168360 A1, con fecha 14 de noviembre de 2002, titulado "Methods of Preventing or Treating Inflammatory or Autoimmune Disorders by Administering Integrin $\alpha\beta 3$ Antagonists in Combination With Other Prophylactic or Therapeutic Agents"); vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb y zinostatina estimalámero.

Una lista no limitante de compuestos que podrían usarse para dirigirse a células madre cancerosas incluye: inhibidores del receptor de interleucina-3 (IL-3R) y CD123 (incluidos péptidos, conjugados de péptido, anticuerpos, conjugados de anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, y conjugados de fragmento de anticuerpo que se dirigen a IL-3R o CD123); cantaridina; norcantaridina y análogos y derivados de esta; inhibidores de la vía Notch que incluyen inhibidores de gamma-secretasa; inhibidores de la vía de sonic hedgehog/suavizada que incluyen ciclopamina y análogos de esta;

anticuerpos para CD96; ciertos inhibidores de NF-kB/proteasoma que incluyen partenolida y análogos de esta; ciertos triterpenos que incluyen celastrol; ciertos inhibidores de mTOR; compuestos y anticuerpos que se dirigen al receptor de urocina; sinfungina; ciertos inhibidores de inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH); agonistas y antagonistas de PPAR-alfa y PPAR-gamma (incluyendo pioglitazona, tesaclitazar, muraglitazar, peliglitazar, lobeglitazona, balaglitazona, ragaglitazar, rosiglitazona, farglitazar, sodelglitazar, reglitazar, naveglitazar, oxeglitazar, metaglitazana, netoglitazona, darglitazona, englitazona, tiazolidinonas, aleglitazar, edaglitazona, rivoglitazona, troglitazona, imiglitazar y sipoglitazar); inhibidores de la telomerasa; anticuerpos para EpCAM (ESA); agonistas y antagonistas de GSK-3 beta (incluyendo litio, 6-bromoinirubin-3'-oxima (BIO), TDZD8); inhibidores de la vía Wnt que incluyen anticuerpos para frizzled o moléculas pequeñas que inhiben dishevelled/frizzled o beta-catenina; anticuerpos anti-CD20 y conjugados (por ejemplo, Rituxan, Bexxar, Zevalin) para el novedoso uso en mieloma múltiple o melanoma; anticuerpo anti-CD133; anticuerpo anti-CD44; anticuerpos para IL-4; ciertos agentes de diferenciación tales como vesnarinona; compuestos que se dirigen a CD33 tales como un anticuerpo o ácido betulínico; compuestos que se dirigen a lactadherina tales como un anticuerpo; moléculas pequeñas o anticuerpos que se dirigen a CXCR4 o SDF-1; moléculas pequeñas o anticuerpos que se dirigen a bombas resistente a múltiples fármacos; inhibidores de survivina; inhibidores de XIAP; moléculas pequeñas que se dirigen a Bcl-2; anticuerpos para CLL-1; e inhibidores de furina (tales como cucurbitacinas).

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

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

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

En otras modalidades, la(s) terapia(s) usada(s) no es un agente antiangiogénico.

En algunas modalidades, la(s) terapia(s) usada(s) en combinación con un compuesto de la invención es un agente antiinflamatorio. Los ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen cualquier agente antiinflamatorio, incluidos agentes útiles en terapias para trastornos inflamatorios, muy conocidas por un experto en la técnica. 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™)), beta2-agonistas (por ejemplo, abuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutalina (BRETHAIRE™ y BRETINE™), albuterol (PROVENTIL™ REPETABS™ y VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™) y salmeterol (SEREVENT™ y SEREVENT DISKUS™)) y metilxantinas (por ejemplo, teofilina (UNIPHIL™, THEO-DUR™, SLO-BID™ Y TEHO-42™)). Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN), etodolaco (LODINA™), fenoprona (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketorolaco (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFFEN™),

sulindaco (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Los ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticosteroides (por ejemplo, metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISONA™ y DELTASONE™), prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, e inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Otros ejemplos de agentes antiinflamatorios pueden encontrarse, por ejemplo, en la publicación de Estados Unidos núm. 005/0002934 A1 en los párrafos 290-294. En otras modalidades, la(s) terapia(s) usada(s) no es un agente antiinflamatorio.

En ciertas modalidades, la(s) terapia(s) usada(s) es un agente alquilante, una nitrosourea, un antimetabolito y antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa II, o un inhibidor mitótico. Los agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, busulfán, cisplatino, carboplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, decarbazina, mecloretamina, mefalán 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 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 los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina).

Se describe el uso de agentes que se dirigen a las células madre cancerosas en combinación con un compuesto de la invención. En algunas modalidades, el agente usado es un agente que se une a un marcador, por ejemplo, antígeno en células madre cancerosas. En una modalidad específica, el agente se une a un antígeno que se expresa a un mayor nivel en las células madre cancerosas que en células madre normales. En una modalidad específica, el agente se une específicamente a un antígeno de célula madre cancerosa. En otras modalidades, la(s) terapia(s) usada(s) descritas es un agente que se une a un marcador en células madre cancerosas. Los ejemplos no limitantes de antígenos en las células madre cancerosas que pueden usarse para dirigirse a las células madre cancerosas incluyen CD34+/CD38-, CD34+/CD38-/CD123+, CD44+/CD24-, CD133+, CD34+/CD10-/CD19-, CD138-/CD34-/CD19+, CD20+, CD133+/RC2+ y CD44+/α2β1hi/C133+. En una modalidad, el agente que se une a un marcador en las células madre cancerosas es un anticuerpo. En otra modalidad, el agente que se une a un marcador en las células madre cancerosas es un ligando. En ciertas modalidades, el anticuerpo o ligando está unido directamente o indirectamente a un resto terapéutico. Los ejemplos no limitantes de restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, un esteroide, citosina arabinósido, fluorouracilo, metotrexato, aminopterina, mitomicina C, demecolcina, etopósido, mitramicina, calicheamicina, CC-1065, clorambucilo o melfalán), radionúclidos, enzimas terapéuticas, citocinas, toxinas que incluyen toxinas derivadas de plantas, toxinas derivadas de hongos, toxina derivada de bacterias (por ejemplo, cadena de ricina A desglucosilada, una proteína inactivadora de ribosomas, alfa-sarcina, aspergillina, restrictocina, una ribonucleasa, una toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, una endotoxina bacteriana o el resto de lípido A de una endotoxina bacteriana), moduladores del crecimiento y RNasa.

Por ejemplo, en una modalidad específica, el agente se une específicamente al receptor de IL-3 (IL-3R). En algunas modalidades, el agente que se une a IL-3R es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que es específico para IL-3R. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está conjugado ya sea químicamente o mediante tecnología recombinante con un resto terapéutico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, una toxina derivada de plantas, hongos o bacterias, un radionúclido) mediante el uso de un agente de enlace para efectuar una respuesta de destrucción de células. En ciertas modalidades, 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 modalidades, el anticuerpo, conjugado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo se une a IL-3R, que contiene tanto las subunidades α como β. Los métodos de preparación de anticuerpos para IL-3R y miméticos de anticuerpos para IL-3R se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,733,743 B2.

En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos que se unen a un marcador en las 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 la del sujeto que recibe la terapia. Los anticuerpos o fragmentos que se unen a marcadores en las células madre cancerosas pueden producirse mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, los párrafos 539-573 de la publicación de Estados Unidos núm. 2005/0002934 A1.

Se describe el uso de agentes que se dirigen a células madre cancerosas. En ciertas modalidades, el agente actúa solo. En otras modalidades, el agente está unido directamente 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, RNasa y antimetabolitos. En algunas modalidades, el agente usado es un agente que se une a un marcador, por ejemplo, un antígeno en una célula madre cancerosa. En una modalidad específica, el agente se une a un antígeno que se expresa a un nivel mayor en células madre cancerosas que en células madre normales. En una modalidad específica, el agente se une específicamente a un antígeno de célula madre cancerosa que no es una célula madre normal. En otras modalidades, la(s) terapia(s) es(son) un agente que se une a un marcador

en células madre cancerosas. En una modalidad, el agente que se une a un marcador en las células madre cancerosas es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo conjugado con un resto terapéutico, o un fragmento de anticuerpo conjugado con un resto terapéutico.

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

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

15 Las terapias para el cáncer actualmente disponibles y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en bibliografía como la Physician's Desk Reference (60ma ed., 2006). De acuerdo con la presente invención, las dosificaciones y frecuencia de administración de agentes quimioterapéuticos se describen arriba.

20 5.4 Métodos de monitorización de células madre cancerosas

Como parte de los regímenes profilácticamente eficaces y/o terapéuticamente eficaces descritos, la población de células madre cancerosas puede monitorizarse para evaluar la eficacia de una terapia así como para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer o la eficacia de un régimen terapéuticamente o profilácticamente eficaz. En ciertas modalidades de las terapias o regímenes profilácticamente eficaces y/o terapéuticamente eficaces descritos, las terapias o regímenes dan como resultado una estabilización o reducción de la población de células madre cancerosas en el paciente. En una
25 modalidad, el sujeto que se somete al régimen se monitoriza para evaluar si el régimen ha dado como resultado una estabilización o reducción de la población de células madre cancerosas en el sujeto.

30 En algunas modalidades, la cantidad de células madre cancerosas en un sujeto se determina mediante el uso de una técnica muy conocida por un experto en la técnica o descrita en la Sección 5.7 más adelante.

Las células madre cancerosas comprenden una única subpoblación (frecuentemente 0,1-10 % más o menos) de un tumor que, a diferencia del 90 % restante más o menos del tumor (es decir, la masa tumoral), son relativamente más tumorigénicas y de crecimiento relativamente más lento o quiescentes. Dado que las terapias y regímenes convencionales han sido diseñados, en gran parte, para atacar células que proliferan rápidamente (es decir, aquellas células cancerosas que comprenden la masa tumoral), las células madre cancerosas de crecimiento más lento pueden ser relativamente más resistente que la masa tumoral de crecimiento más rápido a las terapias y regímenes convencionales. Esto explicaría otro motivo para el fracaso de los regímenes de tratamiento para oncología estándar para garantizar el beneficio a largo plazo en la mayoría de los pacientes con cánceres de estadio avanzado. En una modalidad específica, una célula(s) madre de cáncer es la célula fundadora de un tumor (es decir, es el progenitor de las células cancerosas). En algunas modalidades, una célula(s) madre de cáncer tiene una, dos, tres, o más o todas de las siguiente características o propiedades: (i) puede albergar la capacidad de iniciar un tumor y/o de perpetuar el crecimiento tumoral, (ii) puede estar generalmente relativamente menos mutada que la masa de un tumor (por ejemplo, debido a crecimiento más lento y así menos errores dependientes de la replicación de ADN, reparación de ADN mejorada y/o cambios epigenéticos/no mutagénicos que contribuye a su tumor maligno), (iii) puede tener muchas características de una célula(s) madre normal(es) (por ejemplo, antígeno de superficie celular similar y/o perfil de expresión intracelular, programas de autorrenovación, multirresistencia, un fenotipo inmaduro, etc., característico de células madre normales) y puede derivarse de una célula(s) madre normal(es), (iv) puede ser posiblemente sensible a su microentorno (por ejemplo, las células madre cancerosas pueden ser capaces de ser inducidas para diferenciarse y/o dividirse asimétricamente), (v) puede ser la fuente de metástasis, (vi) puede ser de crecimiento lento o quiescente, (vii) puede ser simétricamente divisora, (viii) puede ser tumorigénica (por ejemplo, como se ha determinado por experimentos de implantación en NOD/SCID), (ix) puede ser relativamente resistente a terapias tradicionales (es decir, quimiorresistente), y (x) puede comprender una subpoblación de un tumor (por ejemplo, con respecto a la masa tumoral).
55

En otras modalidades, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra de un sujeto se determina/evalúa mediante el uso de una técnica descrita en la presente descripción o muy conocida por un experto en la técnica. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas y muestras derivadas de una muestra biológica. En ciertas modalidades, además de la propia muestra biológica o además de material derivado de la muestra biológica tal como células, la muestra usada en los métodos de la presente invención comprende agua añadida, sales, glicerina, glucosa, un agente antimicrobiano, parafina, un agente estabilizante químico, heparina, un anticoagulante, o un agente de tamponamiento. En ciertas modalidades, la muestra biológica es sangre, suero, orina, médula ósea o líquido intersticial. En otra modalidad, la muestra es una muestra de tejido. En una modalidad particular, la muestra de tejido es tejido de mama, cerebro, piel, colon, pulmón, hígado, ovario, pancreático, próstata, renal, hueso o piel. En una modalidad específica, la muestra de tejido es una biopsia de tejido normal o tumoral. La cantidad de muestra biológica tomada del
60
65

5 sujeto variará de acuerdo con el tipo de muestra biológica y el método de detección que va a emplearse. En una modalidad 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 modalidad, la muestra biológica es un tejido y la cantidad de tejido tomada del sujeto es inferior a 10 miligramos, inferior a 25 miligramos, inferior a 50 miligramos, inferior a 1 gramo, inferior a 5 gramos, inferior a 10 gramos, inferior a 50 gramos, o inferior a 100 gramos.

10 De acuerdo con los métodos descritos, una muestra derivada de una muestra biológica es una en la que la muestra biológica se ha sometido 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 ciertas modalidades, un fluido biológico se pretrata mediante centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o mediante una combinación de tales etapas de pretratamiento. En otras modalidades, una muestra de tejido se pretrata mediante congelación, fijación química, incorporación en parafina, deshidratación, permeabilización u homogenización, seguido de centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o por una combinación de tales etapas de pretratamiento. En ciertas modalidades, 15 la muestra se pretrata eliminando células distintas de células madre o las células madre cancerosas de la muestra, o eliminando residuos de la muestra antes de la determinación de la cantidad de células madre cancerosas en la muestra de acuerdo con los métodos de la invención.

20 Las muestras para su uso en los métodos descritos pueden tomarse de cualquier sujeto animal, preferentemente mamífero, con la máxima preferencia un ser humano. El sujeto del que se obtiene una muestra y se utiliza de acuerdo con los métodos incluye, sin limitación, un sujeto asintomático, un sujeto que manifiesta o que presenta 1, 2, 3, 4, o más síntomas de cáncer, un sujeto clínicamente diagnosticado como que tiene cáncer, un sujeto predispuesto al cáncer, un sujeto con sospecha de tener cáncer, un sujeto que recibe la terapia para el cáncer, un sujeto que se ha determinado médicamente libre de cáncer (por ejemplo, después de la terapia para el cáncer), un sujeto que está gestionando el 25 cáncer, o un sujeto que no ha sido diagnosticado con el cáncer. En ciertas modalidades, la expresión "no tiene cáncer detectable", como se usa en la presente descripción, se refiere a un sujeto o sujetos en los que no es detectable el cáncer mediante el uso de un método convencional descrito en la presente descripción (por ejemplo, IRM) o conocido por un experto en la técnica. En otras modalidades, la expresión se refiere a un sujeto o sujetos libres de cualquier trastorno.

30 En ciertas modalidades, la cantidad de células madre cancerosas en un sujeto o una muestra de un sujeto se evalúa antes de la terapia o régimen (por ejemplo, en el nivel inicial) o al menos a los 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 30, 60, 90 días, 6 meses, 9 meses, 12 meses, > 12 meses después de que el sujeto comienza a recibir la terapia o régimen. En ciertas modalidades, la cantidad de células madre cancerosas se evalúa después de un cierto número de 35 dosis (por ejemplo, después de 2, 5, 10, 20, 30, o más dosis de una terapia). En otras modalidades, 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.

40 En ciertas modalidades, una muestra de control positivo o negativo es una muestra que se obtiene o se deriva de un tejido o fluido biológico correspondiente como la muestra a analizar de acuerdo con los métodos descritos. Esta muestra puede provenir del mismo paciente o de personas diferentes y en los mismos o diferentes momentos de tiempo .

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

50 Puede obtenerse una muestra de sangre de un paciente que tiene diferentes estadios de desarrollo o de enfermedad. La sangre puede ser extraída de un sujeto de cualquier parte del cuerpo (por ejemplo, un dedo, una mano, una muñeca, un brazo, una pierna, un pie, un tobillo, un estómago y un cuello) mediante el uso de técnicas conocidas por un experto en la técnica, en particular métodos de flebotomía conocidos en la técnica. En una modalidad específica, se obtiene 55 sangre venosa de un sujeto y se utiliza de acuerdo con los métodos descritos. En otra modalidad, se obtiene sangre arterial y se utiliza de acuerdo con los métodos descritos. La composición de sangre venosa varía de acuerdo con las necesidades metabólicas del área del cuerpo a la que está prestando servicio. Al contrario, la composición de sangre arterial es coherente en todo el cuerpo. Para análisis de sangre rutinarios, se usa generalmente sangre venosa.

60 La cantidad de sangre recolectada variará dependiendo del sitio de recolección, la cantidad requerida para un método, y la comodidad del sujeto. En algunas modalidades, se recolecta cualquier cantidad de sangre que sea suficiente para detectar la cantidad o cantidad de células madre cancerosas. En una modalidad específica, se recolecta 1 cc o más de sangre de un sujeto.

65 La cantidad de células madre cancerosas en una muestra puede expresarse como el porcentaje de, por ejemplo, células globales, células cancerosas globales o células madre globales en la muestra, o se cuantifica con respecto al área (por

ejemplo, células por campo de potencia alto), o volumen (por ejemplo, células por ml), o arquitectura (por ejemplo, células por espícula de hueso en un espécimen de médula ósea).

5 En algunas modalidades, la muestra puede ser una muestra de sangre, muestra de médula ósea o una muestra de
 biopsia de tejido/tumor, 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 de unidad en el caso de un análisis histológico). En ciertas
 modalidades, la población de células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de
 las células cancerosas presentes en la sangre o médula ósea o muestra de biopsia de tejido/tumor o como un
 subconjunto de las células cancerosas presentes en la sangre o médula ósea o muestra de biopsia de tejido/tumor. La
 10 población de células madre cancerosas, en otras modalidades, puede determinarse como una porción (por ejemplo,
 porcentaje) de las células totales. Aún en otras modalidades, 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.

15 En otras modalidades, la muestra del paciente es una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia de un sujeto con o
 con sospecha de tener tejido canceroso), donde la cantidad de células madre cancerosas puede medirse, por ejemplo,
 mediante inmunohistoquímica o citometría de flujo, o basándose en la cantidad de células madre cancerosas por unidad
 de área, volumen, o peso del tejido. En ciertas modalidades, 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. Aún en otras modalidades, la población de
 20 células madre cancerosas se determina como una porción (por ejemplo, un porcentaje) de las células globales o células
 madre en la muestra de tejido.

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

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

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

55 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 recibe el régimen con la muestra de referencia, entonces el
 profesional médico tiene varias opciones posibles para ajustar el régimen. Por ejemplo, el profesional médico puede
 entonces aumentar ya sea la dosificación o la intensidad de la terapia administrada, la frecuencia de la administración,
 la duración de la administración, combinar la terapia con otra(s) terapia(s), cambiar el control por completo, que incluye
 60 detener la terapia, o cualquier combinación de estos.

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

es óptima. Alternativamente, si otro sujeto con leucemia tiene una medición de células madre cancerosas del 2,5 % de su tumor antes de la terapia y el 1 % después de 6 semanas de la terapia, entonces la terapia o régimen puede continuarse debido a que la disminución en el porcentaje de células madre cancerosas indica que la terapia o régimen es eficaz.

5 La cantidad de células madre cancerosas puede monitorizarse/evaluarse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. Pueden monitorizarse células madre cancerosas, por ejemplo, obteniendo una muestra, tal como una muestra de tejido/tumoral, muestra de sangre o una muestra de médula ósea, de un sujeto y detectando las células madre cancerosas en la muestra. La cantidad de células madre cancerosas en una muestra (que puede expresarse como porcentajes, por ejemplo, de células globales o células cancerosas globales) puede evaluarse detectando la expresión de antígenos en células madre cancerosas. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la técnica para medir estas actividades. La expresión de antígenos puede ensayarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, transferencias Western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunofluorescencia, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo y análisis FACS. En tales circunstancias, la cantidad de células madre cancerosas en una muestra de prueba de un sujeto puede determinarse comparando los resultados con la cantidad de células madre en una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de un sujeto que no tiene cáncer detectable) o con un intervalo de referencia predeterminado, o con el propio/la propia paciente en un momento de tiempo temprano (por ejemplo, antes de, o durante la terapia).

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

35 Tabla 2

	Fenotipo de células madre cancerosas
40	Tumor
	Leucemia (LMA) CD34+/CD38-
	Mama CD44+/CD24-
	Cerebro CD133+
	Leucemia (LLA) CD34+/CD10-/CD19-
45	Ovario CD44+/CD24-
	Mieloma múltiple CD138-/CD34-/CD19+
	Leucemia mielógena crónica CD34+/CD38-
	Melanoma CD20+
	Ependimoma CD133+/RC2+
50	Próstata CD44+/α2β1 ^{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 y otros, "SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity", Hematopoiesis 107: 924-930 (2006)), tales como CD150, CD244 y CD48, y aquellos marcadores descritos en la patente de Estados Unidos núm. 6,004,528 de Bergstein, en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite núm. 09/468,286, y en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núms. 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/003 6804.

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

En una modalidad 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 mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas. Este método explota la expresión diferencial de ciertos marcadores de superficie en las células madre cancerosas con respecto a la masa del tumor. Pueden usarse anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos fluorescentes) para

reaccionar con las células en la muestra, y el tejido se tiñe posteriormente. En algunas modalidades, se utiliza una combinación de ciertos marcadores de superficie celular para determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra. Pueden determinarse células madre cancerosas para tipos de tumor específicos evaluando la expresión de ciertos marcadores que son específicos para células madre cancerosas. En ciertas modalidades, los tumores alojan las células madre cancerosas y sus marcadores asociados como se expone en la Tabla 2 anterior.

Los antígenos de células madre cancerosas adecuados pueden identificarse: (i) mediante información públicamente disponible, tal como perfiles de expresión publicados y no publicados que incluyen antígenos de superficie celular de las células madre cancerosas de un tipo de tumor particular o células madre adultas para un tipo de tejido particular (por ejemplo, Tabla 2), y/o (ii) clonando las células madre cancerosas o células madre adultas de un tumor particular o tipo de tejido, respectivamente, para determinar sus perfiles de expresión y complemento de antígenos de superficie celular. La clonación de células madre normales es una técnica rutinariamente empleada en la técnica (Uchida y otros, "Heterogeneity of hematopoietic stem cells", *Curr. Opin. Immunol.* 5:177-184 (1993)). En realidad, esta misma técnica se usa para identificar células madre normales y células madre cancerosas. Además, la suposición de que una proporción de productos génicos de células madre normales, por ejemplo antígenos de superficie celular, también estará presente en las células madre cancerosas derivadas del mismo tipo de tejido ha demostrado ser una forma eficaz de identificación de productos génicos de células madre cancerosas y células madre cancerosas. Por ejemplo, el conocimiento de que la célula madre hematopoyética normal era CD34+/CD38- produjo la determinación de que las células madre de leucemia mieloide aguda (LMA) eran similarmente CD34+/CD38-. Esto de hecho se confirmó por técnicas de clonación de células madre estándar (véase Bonnet y otros, "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell", *Nat. Med.* 3:730-737 (1997)). Células madre cancerosas cerebral fueron similarmente aisladas mediante el uso de un marcador de células madre normal (cerebro), en este caso CD133 (véase Singh y otros "Identification of human brain tumor initiating cells", *Nature* 432(7015):396-401 (2004)).

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

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

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

En otras modalidades, se mide la formación de esferas para determinar la cantidad de células madre cancerosas en una muestra (por ejemplo, las células madre cancerosas forman agrupaciones tridimensionales de células, llamadas esferas) en medios apropiados que son propicios para formar esferas. Las esferas pueden ser cuantificadas para proporcionar una medida de células madre cancerosas. Véase Singh y otros, "Identification of a Cancer Stem Cell from Human Brain Tumors", *Cancer Res.* 63: 5821-5828 (2003). También pueden medirse esferas secundarias. Las esferas

secundarias se generan cuando las esferas que se forman a partir de la muestra de paciente se separan, y entonces se permite que se vuelvan a formar. De esta forma, el ensayo de formación de esferas podría usarse para medir la cantidad de células madre cancerosas pre y postterapia para evaluar el cambio en la cantidad de células madre cancerosas que surge de una terapia o régimen dado.

5

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

10

15

20

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

25

30

35

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

40

45

50

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

55

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

60

5.5 Métodos de monitorización de células cancerosas

Como parte de los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces descritos la cantidad de células cancerosas (sola o en combinación con la cantidad de células madre cancerosas) puede monitorizarse/evaluarse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. En ciertas modalidades de los

65

regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces descritos, los regímenes producen una estabilización o reducción de la cantidad (expresada, por ejemplo, como un porcentaje) de células cancerosas en el sujeto. En una modalidad, el sujeto que recibe el régimen se monitoriza para determinar si el régimen ha producido una estabilización o reducción de la cantidad (expresada, por ejemplo, como un porcentaje) de células cancerosas en el sujeto.

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

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

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

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

La cantidad de células cancerosas en una muestra puede expresarse como el porcentaje de, por ejemplo, células globales en la muestra. En algunas modalidades, la muestra es una muestra de sangre o 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 de unidad en el caso de un análisis histológico). La población de células cancerosas, en ciertas modalidades, puede determinarse como un porcentaje de los glóbulos sanguíneos totales.

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

La cantidad de células cancerosas en la muestra de prueba puede compararse con la cantidad de células cancerosas medida en una(s) muestra(s) de referencia para evaluar la eficacia del régimen. En una modalidad, la muestra de referencia es una muestra del sujeto que recibe la terapia, en un momento de tiempo temprano (por ejemplo, antes de recibir el régimen como una muestra de referencia del nivel inicial, o en un momento de tiempo anterior mientras que recibe la terapia). En esta modalidad, la terapia deseablemente 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 modalidad, 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 modalidad, la terapia deseablemente da como resultado la muestra de prueba que tiene una cantidad igual de células cancerosas como se detecta en la muestra de referencia (por ejemplo, células cancerosas no detectables).

Si se calcula que la reducción en la cantidad de células cancerosas es demasiado pequeña, entonces el profesional médico tiene varias opciones para ajustar el régimen. Por ejemplo, el profesional médico entonces puede ya sea aumentar la dosificación de la terapia administrada, la frecuencia de la administración, la duración de la administración, combinar la terapia con otra(s) terapia(s), detener la terapia, o cualquier combinación estos.

5

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

10

15

20

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

25

30

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

35

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

40

45

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

50

55

5.6 Métodos de monitorización del recuento de células de linfocitos, recuento de células de neutrófilos, recuento de plaquetas y hemoglobina

60

Como parte de los regímenes profilácticamente y/o terapéuticamente eficaces, pueden monitorizarse/evaluarse recuentos de linfocitos de sangre periférica mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. Los recuentos de linfocitos de sangre periférica en un sujeto pueden determinarse, por ejemplo, obteniendo una muestra de sangre periférica de dicho sujeto, separando los linfocitos de otros componentes de sangre periférica tales como plasma mediante el uso de, por ejemplo, centrifugación en gradiente en Ficoll-Hypaque (Pharmacia) y contando los linfocitos mediante el uso de azul de tripano. Pueden determinarse recuentos de linfocitos T de sangre periférica en un sujeto, por ejemplo, separando los linfocitos de otros componentes de sangre periférica tales como plasma mediante el uso de, por ejemplo, centrifugación en gradiente en Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Marcar los linfocitos T con un

65

5 anticuerpo dirigido a un antígeno de linfocitos T tal como CD3, CD4 y CD8 que está conjugado con un agente detectable por FACS, tal como FITC o ficoeritrina, y medir la cantidad de linfocitos T por FACS. Además, el efecto sobre un subconjunto particular de linfocitos T (por ejemplo, CD2+, CD4+, CD8+, CD45+, CD45RO+, CD45RA+, o CD8+RA+) o linfocitos NK puede determinarse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica, tales como FACS.

10 El recuento de neutrófilos absoluto del sujeto (ANC) puede monitorizarse/evaluarse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. En algunas modalidades, el régimen incluye monitorizar el ANC del paciente para evitar el riesgo del paciente de desarrollar neutropenia.

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

20 El recuento de plaquetas del sujeto (PLT) puede monitorizarse/evaluarse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. En algunas modalidades, el régimen incluye monitorizar el recuento de plaquetas del paciente para evitar el riesgo de que el paciente desarrolle trombocitopenia o se vuelva dependiente de transfusiones de sangre. Las transfusiones pueden darse según lo determina el médico.

25 La hemoglobina del sujeto (Hgb) puede monitorizarse/evaluarse mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por un experto en la técnica. En algunas modalidades, el régimen incluye monitorizar la hemoglobina del paciente para evitar el riesgo de que el paciente desarrolle anemia o se vuelva dependiente de transfusiones. Las transfusiones o factores de crecimiento (por ejemplo, eritropoyetina) pueden darse según lo determina el médico .

25 5.7 Ensayos biológicos

5.7.1 Ensayos *in vitro*

30 Los compuestos, composiciones farmacéuticas y regímenes descritos pueden probarse *in vitro* y/o *in vivo* para su capacidad para reducir la cantidad de células cancerosas y/o células madre cancerosas, o inhibir su proliferación. La capacidad de un compuesto o un régimen para reducir la cantidad de células cancerosas, las células madre cancerosas y/o células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos) o inhibir su proliferación puede evaluarse: detectando la expresión de antígenos en 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. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para medir estas actividades. Por ejemplo, la proliferación celular puede ensayarse mediante ensayos de incorporación de ³H-timidina y recuentos de células con azul de tripano. La expresión de antígenos puede ensayarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos mediante el uso de técnicas tales como transferencias Western, inmunohistoquímica radioinmunoensayos, ELISA (ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A y análisis FACS.

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

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

65 Ensayo en adoquín: El ensayo de células formadoras de área en adoquín (CAFC) explota un punto final visual reproducible para la cuantificación de células madre cancerosas. Se añaden muestras de leucemia a cultivos adherentes de células del estroma, en algunas modalidades, células del estroma MS-5. Las células madre cancerosas

en el cultivo migrarán debajo de las células del estroma MS-5 y formarán un colonia de células llamada un adoquín que puede cuantificarse visualmente. Para probar el efecto de la cantaridina o norcantaridina sobre la población de células madre cancerosas mediante el uso de este ensayo, las células se cultivan primero en presencia del fármaco. En algunas modalidades, las células se cultivan durante 16 horas. Después de esta incubación, las células se añaden a los cultivos de estroma. Una reducción de la formación de área en adoquín en los cultivos que se trataron con el fármaco en comparación con las células sin tratar representa la actividad de las células madre cancerosas para el fármaco.

5.7.2 Ensayos *in vivo*

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

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

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

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

En una modalidad específica, la cantidad de células madre cancerosas se detecta *in vivo* en un sujeto de acuerdo con un método que comprende las etapas de: (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente de unión de marcador de célula madre cancerosa marcada que se une específicamente a un marcador de superficie de célula

encontrado en las células madre cancerosas, y (b) detectar el agente marcado en el sujeto después de un intervalo de tiempo suficiente para permitir que el agente marcado se concentre en sitios en el sujeto donde se expresa el marcador de superficie de célula madre cancerosa. De acuerdo con esta modalidad, el agente de unión de marcador de superficie de célula madre cancerosa se administra al sujeto de acuerdo con cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), o por vía intraperitoneal. De acuerdo con esta modalidad, la cantidad eficaz del agente es la cantidad que permite la detección del agente en el sujeto. Esta cantidad variará de acuerdo con el sujeto particular, la marca usada y el método de detección empleado. Por ejemplo, se entiende en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes usado determinarán la cantidad de agente marcado necesario para detectar el agente en un sujeto mediante el uso de obtención de imágenes. En el caso de un agente radiomarcado para un sujeto humano, la cantidad de agente marcado administrado se mide en términos de radiactividad, por ejemplo de alrededor de 5 a 20 millicurios 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 los sitios en el sujeto donde el marcador de superficie de células madre cancerosas se expresa variará dependiendo de varios factores, por ejemplo, el tipo de marca usada, el modo de administración y la parte del cuerpo del sujeto de la que se obtienen imágenes. En una modalidad particular, el intervalo de tiempo que es suficiente es 6 a 48 horas, 6 a 24 horas, o 6 a 12 horas. En otra modalidad, el intervalo de tiempo es 5 a 20 días o 5 a 10 días. La presencia del agente de unión de marcado de superficie de células madre cancerosas marcadas puede detectarse en el sujeto mediante el uso de medios de obtención de imágenes conocidos en la técnica. En general, los medios de obtención de imágenes empleados dependen del tipo de marca usada. Los expertos en la técnica serán capaces de determinar los medios apropiados para detectar una marca particular. Los métodos y dispositivos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (CT), barrido de cuerpo entero tal como tomografía de emisión de positrones (PET), imagen por resonancia magnética (IRM), fluorescencia, quimioluminiscencia, un generador de imágenes que puede detectar y localizar marca fluorescente y sonografía. En una modalidad específica, el agente de unión de marcador de superficie de células madre cancerosas se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente mediante el uso de un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,441,050). En otra modalidad, el agente de unión de marcador de superficie de células madre cancerosas se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente mediante el uso de un instrumento de barrido sensible a la fluorescencia. En otra modalidad, el agente de unión de marcador de superficie de células madre cancerosas se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente mediante el uso de tomografía de emisión de positrones. En otra modalidad más, el agente de unión de marcador de superficie de células madre cancerosas se marca con una marca paramagnética y se detecta en un paciente mediante el uso de imagen por resonancia magnética (IRM).

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

5.7.3 Evaluación de toxicidad

La toxicidad y/o eficacia de los compuestos, composiciones farmacéuticas y regímenes descritos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren regímenes terapéuticos que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse regímenes terapéuticos que presentan efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija tales agentes al sitio de tejido afectado para minimizar el posible daño a células no infectadas y así reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación de las terapias para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad a tejidos normales. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia usada en el método, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición al 50 % de síntomas) como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud las dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse los niveles de compuestos en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

5.8 Artículos de fabricación

Se describe un envase acabado y producto farmacéutico etiquetado. Este artículo de fabricación incluye la forma de dosificación unitaria apropiada en un recipiente o contenedor apropiado tal como un vial de vidrio u otro recipiente que esté herméticamente cerrado. El producto farmacéutico puede contener, por ejemplo, un conjugado de la invención en una forma de dosificación unitaria en un primer recipiente, y en un segundo recipiente, agua estéril para inyección.

Alternativamente, la forma de dosificación unitaria puede ser un sólido adecuado para suministro oral, transdérmico, intranasal o tópico.

5 En una modalidad específica, la forma de dosificación unitaria es adecuada para suministro parenteral, intravenoso, intramuscular, intranasal, oral, intraperitoneal, tópico o subcutáneo. Por lo tanto, la invención abarca disoluciones, preferentemente estériles, adecuadas para cada vía de suministro.

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

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

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

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

30 En una modalidad, el paquete o kit farmacéutico comprende en uno o más recipientes un agente de unión de marcador de superficie de células madre cancerosas. En una modalidad particular, el agente es un anticuerpo que se une selectivamente o específicamente a un marcador de superficie de células madre cancerosas. En una modalidad particular, el agente es un anticuerpo (que incluye, por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab o F(ab)₂ o fragmentos de unión al epítipo), que reacciona de forma cruzada con cualquier marcador de superficie de células madre cancerosas. En otra modalidad, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con cualquiera de los marcadores de superficie de células madre cancerosas enumerados en la Tabla 2. En otra modalidad, el anticuerpo reacciona con cualquiera de los marcadores de superficie de células madre cancerosas enumerados en la Tabla 1 de la patente de Estados Unidos núm. 6,004,528 o las Tablas 1, 2, o 3 de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 09/468,286, y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núms. 2006/0083682, 2007/0036800, 2007/0036801, 2007/0036802, 2007/0041984, 2007/0036803 y 2007/0036804.

35 De acuerdo con esta modalidad, 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.

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

65 Para kits de micromatrices de ácido nucleico, los kits generalmente comprenden (pero no se limitan a) sondas específicas para ciertos genes unidas a una superficie de soporte sólido. En otras modalidades, las sondas son

solubles. En una modalidad tal, las sondas pueden ser ya sea oligonucleótidos o sondas de longitud más larga que incluyen sondas que oscilan de 150 nucleótidos de longitud a 800 nucleótidos de longitud. Las sondas pueden marcarse con una marca detectable. Los kits de micromatrices pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes del rendimiento del ensayo. Los kits también pueden comprender reactivos de hibridación y/o reactivos necesarios para detectar una señal producida cuando una sonda se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos de marcador de superficie de células madre cancerosas. Generalmente, los materiales y reactivos para los kits de micromatrices están en uno o más recipientes. Cada componente del kit está generalmente en su propio recipiente adecuado.

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

Un kit también puede comprender, opcionalmente, una cantidad predeterminada de un polipéptido de 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 su uso como un estándar o control. Los métodos de diagnóstico descritos pueden ayudar a realizar o monitorizar un estudio clínico.

Pueden usarse muestras de prueba adecuadas, por ejemplo, de suero o tejido, obtenidas de un sujeto para el diagnóstico.

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

6. Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, y no deben visualizarse como limitantes del alcance de la presente invención. Pueden hacerse variaciones razonables, tales como las que se le ocurren a un experto razonable, en la presente descripción sin apartarse del alcance de la presente invención.

6.1 Ejemplo 1 (comparativo)

6.1.1 Pacientes y diseño del estudio

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

Los pacientes fueron diagnosticados con LMA basándose en la biopsia de médula ósea y cualquiera de recaída de enfermedad o LMA de riesgo elevado (síndrome mielodisplásico (SMD) previo, relacionado con el tratamiento, edad de los pacientes >70 años, o citogenética no favorable y no candidato para trasplante alógeno). Los pacientes tenían que tener un estado general <2, WBC <10 000/ml, bilirrubina <1,5 mg/dl, transaminasas <2,5x límite superior normal, albúmina >3 g/dl, creatinina <1,5 mg/dl, reserva cardíaca adecuada (EF>40 %), concentración en suero pretratamiento anti-DT <2,4 µg/ml, estar dispuesto a dar consentimiento informado y tratarse en un sitio autorizado, estar dispuesto a usar una forma autorizada de control de la natalidad mientras que está en el estudio, no tener problemas médicos graves simultáneos o infecciones no controladas o DIC o embarazo, no tener leucemia del SNC activa, no haber tenido un infarto de miocardio en el plazo de los últimos seis meses, no requerir oxígeno, y no tener un alergia a la toxina diftérica.

Los pacientes se ingresaron en el hospital, se les dio alopurinol, solución salina normal, moxifloxacino, fluconazol, vitamina K, acetaminofeno, difenhidramina e hidrocortisona y la dosis de aumento inter-individual de DT388IL-3 IV durante 15 minutos en M-X-V durante dos semanas. Se trataron cohortes de al menos 3 pacientes a cada nivel de dosis. Los pacientes se monitorizaron para toxicidades mediante el uso de NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 3.0. Las constantes vitales se midieron frecuentemente en los días de tratamiento. Se

registró diariamente la entrada/salida cuidadosa. Se probaron diariamente CBC, CMP, panel de coagulación, LDH, ácido úrico y magnesio. Se extrajo sangre para estudios de farmacología clínica que incluyen farmacocinética y respuesta inmunitaria. Se repitieron biopsias de la médula ósea en el día 15, 30, 60, y cada tres meses hasta la recaída. Las respuestas se midieron basándose en las recomendaciones revisadas del grupo de trabajo internacional.

5

6.1.2 Resultados

Se han tamizado cuarenta y nueve pacientes con LMA y veintisiete pacientes tratados (Tabla 3). La mediana de la edad de los pacientes tratados fue 59 años (intervalo, 25-81 años). Hubo trece hombres y catorce mujeres. La enfermedad era *de novo* en dos, primera recaída en diez, segunda recaída en siete, y refractaria en ocho pacientes. Tres pacientes tenían una historia de SMD, y uno tuvo una historia de LMA secundaria. Un paciente había recibido previamente un trasplante autólogo o alógeno de células madre cada uno. Las citogenéticas fueron desfavorables en diez, intermedia en dieciséis, y no se hizo en uno. Siete pacientes se trataron con 4 µg/kg, ocho pacientes se trataron con 5,3 µg/kg, once pacientes se trataron con 7,1 µg/kg y un paciente se trató con 9 µg/kg de DT₃₈₈IL-3 (Tabla 4). Las toxicidades relacionadas con los fármacos fueron de leves a moderadas y transitorias, que incluyen fiebre, escalofríos, hipotensión, hipoxemia e hipoalbuminemia. De entre veintisiete pacientes evaluables, los presentes inventores han observado una CR en curso de 6+ meses de duración, dos remisiones parciales (PR) que duran uno y dos+ meses y tres respuestas mínimas con eliminación de blastos periféricos y citorreducciones de blastos de médula ósea del 89 %, 90 % y 93 % que duran de uno a dos meses (Tabla 5 y Figura 4).

10

Las toxicidades hasta la fecha en el estudio clínico han sido de leves a moderadas. Se produjeron fiebres, pero respondieron a acetaminofeno y métodos de enfriamiento. La hipotensión y uremia transitoria respondieron a hidratación. La hipoxemia e hipoalbuminemia se invirtieron con infusiones de albúmina y diuresis. No se ha observado disfunción hepática significativa. Después del estudio clínico de DT₃₈₈ GMCSF, los presentes inventores establecieron un modelo preclínico para la toxicidad del hígado mediante el uso de moléculas de fusión de DT con GMCSF murino e IL-3, DT₃₈₈mGMCSF y DT₃₈₈mIL-3, respectivamente. 27 Ratas tratadas con DT₃₈₈mGMCSF, pero no DT₃₈₈mIL-3, mostraron lesión de células de Kupffer, hinchazón de hepatocitos y transaminasemia. La carencia de receptor de IL-3 en células de Kupffer parece proteger del daño del hígado. Estudios en mono y clínicos hasta la fecha confirman ese hallazgo.

15

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

20

25

30

35

40

45

50

55

60

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

	Paciente núm.	Nivel de dosis (µg/kg)	Toxicidades Gr2 CTCV3	Anticuerpo anti-DT (µg/ml)		
				d1	d15	d30
5	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
10	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
15	10	5,32	Alb	0,5	ND	1,1
	11	5,32	F, Alb, Trans	2,5	ND	ND
	12	5,32	Hipo, F, Alb	1,3	600	ND
	13	5,32	Alb	1,5	ND	ND
	14	5,32	Alb, Trans	0,3	0,3	ND
	15	5,32	Alb, Trans	0	1,6	29
20	16	7,07	Alb, Trans	1	0	ND
	17	7,07	Alb	1,2	ND	ND
	18	7,07	F, Alb, Disn	0,7	0,4	ND
	19	7,07	VLS, Alb, Disn	0,8	8,3	22,4
	20	7,07	Alb, Trans	0,4	ND	ND
25	21	7,07	Alb, Trans	2,1	1,5	4,2
	22	7,07	Alb, Trans	1,7	1,2	ND
	23	7,07	F, Alb, VLS	2,2	32	104
	24	7,07	0	4,3	ND	4
	25	7,07	Alb	3,8	ND	ND
	26	7,07	F, Alb, Trans	0,5	ND	ND
30	27	9,4	F, Alb, Trans	3	ND	ND
	28	9,4	F, Alb	1,3	300	ND
	29	7,07	F, Alb	1,5	ND	ND
	30	9,4	Alb	3	0,8	ND
35	31	9,4	F, Trans	2,3	ND	ND
	32	9,4	Alb, Trans	2,2	3,1	ND
	33	9,4	Alb, Trans	1,2	ND	ND
	34	9,4	Alb, Trans	2,2	ND	306
	35	9,4	Alb	0,8	252	ND
	36	12,5	Alb, Trans	1,3	11,2	16,8

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

45

50

55

60

65

Tabla 4 Nivel de dosis y efectos tóxicos relacionados con los fármacos de pacientes con LMA tratados con DT₃₈₈IL3

Paciente núm.	Dosis µg/kg/ día	Gr 2 relacionado con el fármaco o efectos secundarios más altos (grado de toxicidad de CTC)
1	4	Gr 2 náuseas; Gr 2 vómitos; Gr 2 ALT
2	4	Ninguno
3	4	Gr 2 hipotensión; Gr 2 taquicardia sinusal; Gr 2 fiebre; Gr 2 aumento de peso; Gr 2 náuseas; Gr 2 vómitos; Gr 2 hipoalbuminemia;
4	4	Gr 2 fiebre; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia
5	4	Gr 2 fiebre; Gr 2 escalofríos moderados/escalofríos intensos; Gr 2 CPK; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia
6	4	Gr 2 hipotensión; Gr 2 hipocalcemia
7	4	Gr 2 hipoalbuminemia
8	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia
9	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 AST; Gr 2 ALT
10	5,32	Gr 2 taquicardia supraventricular; Gr 2 hipoalbuminemia
11	5,32	Gr 2 fiebre; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 AST; Gr 2 ALT
12	5,32	Gr 2 hipotensión; Gr 2 fiebre; Gr 2 escalofríos moderados/escalofríos intensos; Gr 2 aumento de peso; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia
13	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia
14	5,32	Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 ALT
15	5,32	Gr 2 fatiga; Gr 2 escalofríos moderados/escalofríos intensos; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 ALT
16	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 ALT
17	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia
18	7,07	Gr 2 hipertensión; Gr 2 fatiga; Gr 2 fiebre; Gr 2 urticaria/descamación; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 debilidad muscular, cuerpo entero/generalizado; Gr 2 Disnea
19	7,07	Gr 2 síndrome de fuga vascular agudo; Gr 2 hipertensión; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 disnea; Gr 2 hipoxia
20	7,07	Gr 2 hiperbilirrubinemia; Gr 2 hiperglucemia; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 AST; Gr 2 ALT
21	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia, Gr 2 AST, Gr 2 ALT
22	7,07	Ninguno
23	7,07	Gr 2 fiebre; Gr 2 hipocalcemia; Gr 2 hipoalbuminemia; Gr 2 síndrome de fuga vascular agudo
24	7,07	Ninguno
25	7,07	Gr 2 hipoalbuminemia
26	7,07	Gr 2 AST
27	9	Gr 2 fiebre; Gr 2 ALT; Gr 2 hipoalbuminemia

Tabla 5. Respuestas clínicas a DT₃₈₈IL3

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

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

6.2 Ejemplo 2 (comparativo)

6.2.1 Pacientes y métodos

Los pacientes tenían que tener LMA basada en biopsia de médula ósea y ya sea enfermedad, recaída de enfermedad, enfermedad resistente o LMA de riesgo alto (SMD previo, relacionado con el tratamiento, edad de los pacientes >70 años, o citogenética no favorable y no candidato para trasplante alógeno). Los pacientes tenían que tener un estado general <2, WBC <10 000/ml, bilirrubina <1,5 mg/dl, transaminasas <2,5x límite superior de lo normal, albúmina >3 g/dl, creatinina <1,5 mg/dl, reserva cardíaca adecuada (EF>40 %), concentración en suero pretratamiento anti-DT <2,4 µg/ml, estar dispuesto a dar consentimiento informado y tratarse en un sitio autorizado, estar dispuesto a usar una forma autorizada de control de la natalidad mientras que está en el estudio, no tener problemas médicos graves simultáneos o

infecciones no controladas o DIC o embarazo, no tener leucemia del SNC activa, no haber tenido un infarto de miocardio en el plazo de los últimos seis meses, no requerir oxígeno, y no tener una alergia a DT.

Los pacientes recibieron infusiones de 15 minutos de DT₃₈₈L-3 tres veces a la semana durante dos semanas con aumento de dosis inter-individual a dosis de 4-12,5 µg/kg/dosis.

6.2.2 Resultados - características de los pacientes

Sesenta y cinco pacientes con LMA han sido tamizados hasta la fecha y treinta y seis pacientes tratados (Tabla 6). La mediana de la edad de los pacientes tratados era 60 años (intervalo, 25-81 años). Hubo veinte hombres y dieciséis mujeres. La enfermedad era LMA *de novo* en cuatro, LMA de primera recaída en once, LMA de segunda recaída en ocho y LMA resistente en doce pacientes. Un paciente tuvo SMD. Siete pacientes con LMA tuvieron una historia de SMD, y uno tuvo una historia de LMA secundaria. Un paciente había recibido previamente un trasplante autólogo o alógeno de células madre cada uno. Las citogenéticas fueron desfavorables en doce que incluían el paciente con SMD, intermedio en veintiuno y no hechas en tres. Siete pacientes se trataron con 4 mg/kg, ocho pacientes se trataron con 5,3 µg/kg, doce pacientes se trataron con 7,1 mg/kg y ocho pacientes se trataron con 9,4 µg/kg, un paciente se trató con 12,5 µg/kg de DT₃₈₈L-3.

Tabla 6

Características clínicas de pacientes con LMA tratados con DT ₃₈₈ L3				
Paciente núm.	Edad (años)/sexo	Estado de enfermedad	Historia de tratamiento	Citogenética
1	38/M	1º rel	7 + 3; HiDAC	Normal
2	53/F	2º rel	7 + 3/Ida/Ara-C; 7 + 3/Ida/Ara-C; 5 + 3/Ida/Ara-c Mylotarg	+8
3 ^b	67/F	1º rel	Carbo/Taxol; Gleevea después Ida/Citarabina; Mylotarg	-4, -18, -19, del 5, +7
4 ^a	67/F	2º rel	Ida/Ara-C; Mylotarg; Campath/Cytosan; madre alógenas; Mylotarg; DLI; DLI; Mylotarg; DLI	Normal
5	57/M	1º rel	7&3/Citarabina/Dauno; 5&2/Citarabina/dauno; Citarabina/Mylotarg; Cytoxan/VP-18	+13
6 ^a	54/M	2º rel	Ara-C/Ida; Ara-C/Gem/CPT-11; Ara-C/etopósido; trasplante de células madre; BiSulphace/VP-18; madre autólogas	-7
7 ^b	51/M	2º rel	7 + 3 + 3; Ara-C/L-asparaginasa; Ara-C/VP-16, Busulfán/ VP-16 más madre autólogas; Ara-C/Mito/L-asparaginasa; Ara-C/Mito/L-asparaginasa; Mylotarg	t (6; 12)
8	82/M	1º rel	Citarabina/Dauno	t(3; 21)(q26; q26)
9	83/M	1º rel	Citarabina/Dauno	Normal
10	89/M	1º rel	Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C; Dauno/Ara-C	Normal
11	54/F	Ref	ERYC/Ida (7 + 3); ERYC	Normal
12	81/F	De Novo		+8, +9
13	76/M	2º rel	Ida/Ara-C; VP16/Mito/Ara-C; Mylotarg; Vion/Timidor; Gem/Fludarabina/Mito	Normal
14	67/F	Ref	Inducción de ERYC/Ida (7 + 3)	t(11; 18) (q25; q21), del (9) (p22p24); +8
15	25/F	2º rel	Terapia de inducción de 7 + 3; mini VP-16/Cytosan/ Ara-C; reinducción de CECA seguido de 7 + 3	t(9; 11) (p22; q23)
16	44/F	Ref	HiDAC/dauno; VP-16/Ciclofosfamida	Normal
17	62/M	Ref	Terapia de inducción de 7 + 3; 6 + 2/Citarabina/Asparaginasa; Clorotoxina/Tomodar; Mitn/Gem/Fludarabina	t(1; 4) (q42; q21), t(4; 12) (q12; p13)
18	62/F	1º rel	Inducción de 7 + 3	Normal
19	72/F	Ref	Inducción de 7 + 3	Normal
20	62/M	1º rel	Citarabina/Ida	añadir (2) (p21), añadir (3) (p25), -4, -7, si del (17) (q23), dsll, del (11) (q23)

Características clínicas de pacientes con LMA tratados con DT ₃₈₈ L3				
Paciente núm.	Edad (años)/sexo	Estado de enfermedad	Historia de tratamiento	Citogenética
21 ^b	59/F	1º rel	Ara-C/dauno; rescate con VP-16/ciclo	t (1; 5)
22	32/M	Ref	Ara-C/dauno; VP-16/Mito; Ara-C/dauno; VP-16/Cytoxan	del (7) (q22q34)
23	73/F	1º rel	Ciclosporina, daunorubicina, citarabina	+11, -12, der (17) t (12; 17) (q10; p12)
24	33/M	2º rel	ADE-10; MACE/Midac; Hydrea/leucoforesis; Citosina/Ara-C	Normal
25 ^b	66/F	Ref	Revlimid, 7 + 3, L-001281814/MK0457	del (5) (q23), -12, -13, añadir (16) (q22), + mero 20
26	73/F	Ref	Ara-C/dauno; 7 + 3	Normal
27	70/F	De Novo		ND
28	60/M	Ref	7 + 3	del (5)
29	41/F	2º rel	7 + 3; Hi-Dos Citarabina; reinducción de 7 + 3	Normal
30	32/M	Ref	HiDAC/dauno; VP-16/Ciclofosfamida; HiDAC	ND
31 ^b	77/M	De Novo		Normal
32 ^b	72/M	Ref	Ara-C	-Y
33	78/M	1º rel	7 + 3; Hi-Dos Citarabina	Normal
34	77/M	De Novo		ND
35 ^b	65/M	Ref	7 + 3, Ara-C de alta dosis, PT-523	(q5), del (7), t (16; 17)
36	71/M	MDS	6-azacitidina; decitabina	-7

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

6.2.3 Resultados - toxicidades

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

Paciente núm.	Nivel de dosis (ug/kg)	Toxicidades Gr2 CTCV3	C _{máx} d1/d12 (mg/ml)		Anticuerpo anti-DT (mg/ml)			Respuesta clínica
			d1	d12	d1	d15	d30	
1	4	N-V, Trans	0	0	0,8	23	235	0
2	4	0	0	0	2,5	ND	ND	0
3	4	F, N-V, Alb, Hipo	0	0,18	0	ND	36	0
4	4	F, Alb	ND	ND	0	ND	ND	0
5	4	F, Alb	ND	ND	0	ND	48	0
6	4	Hipo	ND	ND	0,9	ND	36	0
7	4	Alb	0	0	2,2	1	6,2	0
8	5,32	Alb	0,19	0	1	221	263	0
9	5,32	Alb, Trans	0,14	0,15	0,8	440	ND	PR
10	5,32	Alb	0,22	ND	0,5	ND	1,1	0
11	5,32	F, Alb, Trans	0	ND	2,5	ND	ND	0
12	5,32	Hipo, F, Alb	0,34	0	1,3	600	ND	0
13	5,32	Alb	0	0,3	1,5	ND	ND	MR
14	5,32	Alb, Trans	0,38	0,36	0,3	0,3	ND	MR
15	5,32	Alb, Trans	0,06	0,29	0	1,6	29	MR
16	7,07	Alb, Trans	ND	0,21	1	0	ND	0
17	7,07	Alb	ND	ND	1,2	ND	ND	0
18	7,07	F, Alb, Disn	0,22	0,37	0,7	0,4	ND	0
19	7,07	VLS, Alb, Disn	0,32	0,54	0,8	8,3	22,4	CR
20	7,07	Alb, Trans	0,48	ND	0,4	ND	ND	0
21	7,07	Alb, Trans	0,08	0,35	2,1	1,5	4,2	0
22	7,07	Alb, Trans	0,13	0,29	1,7	1,2	ND	0

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

Paciente núm.	Nivel de dosis (ug/kg)	Toxicidades Gr2 CTCV3	Cmáx d1/d12 (mg/ml)		Anticuerpo anti-DT (mg/ml)			Respuesta clínica
					d1	d15	d30	
23	7,07	F, Alb, VLS	0,61	ND	2,2	32	104	PR
24	7,07	0	0	0,38	4,3	ND	4	0
25	7,07	Alb	0,11	ND	3,8	ND	ND	0
26	7,07	F, Alb, Trans	0,23	ND	0,5	ND	ND	0
27	9,4	F, Alb, Trans	0,18	ND	3	ND	ND	0
28	9,4	F, Alb	0,27	ND	1,3	300	ND	0
29	7,07	F, Alb	ND	ND	1,5	ND	ND	0
30	9,4	Alb	0,15	0,32	3	0,8	ND	0
31	9,4	F, Trans	0,23	ND	2,3	ND	ND	0
32	9,4	Alb, Trans	0,26	0,38	2,2	3,1	ND	0
33	9,4	Alb, Trans	0,37	ND	1,2	ND	ND	0
34	9,4	Alb, Trans	0,55	ND	2,2	ND	306	0
35	9,4	Alb	0,23	0	0,8	252	ND	0
38	12,5	Alb, Trans	0,34	ND	1,3	11,2	16,8	PR

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

6.2.4 Resultados - respuesta inmunitaria

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

6.2.5 Resultados - respuesta clínica

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

Tabla 8 Respuestas clínicas de DT₃₈₈IL3

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

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

7. Equivalentes

La presente invención no debe limitarse en alcance por las modalidades específicas descritas que están previstas como ilustraciones únicas de aspectos individuales de la invención.

De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente descripción, serán evidentes para los expertos en la técnica de la descripción anterior y dibujos adjuntos mediante el uso de no más que experimentación rutinaria. Tales modificaciones y equivalentes pretenden entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de interleucina-3 humana (IL-3)-toxina diftérica para su uso en un método para tratar un cáncer de células dendríticas plasmocitoides en un ser humano, en donde dicho método comprende administrar dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica a dicho ser humano.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con 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 dendríticas plasmocitoides cancerosas en dicho ser humano, y en donde el método comprende administrar a dicho ser humano el conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica:
 - 15 (i) a una dosis de alrededor de 4,0 µg/kg por día a alrededor de 12,5 µg/kg por día; o
 - (ii) a una dosis de alrededor de 5,3 µg/kg por día, alrededor de 7,1 µg/kg por día, alrededor de 9,4 µg/kg por día, o alrededor de 12,5 µg/kg por día.
- 20 3. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el método comprende administrar dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica a una dosis que es la dosis máxima tolerada.
- 25 4. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el método comprende administrar dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica:
 - (i) al menos dos veces a la semana;
 - (ii) al menos tres veces a la semana;
 - (iii) durante un periodo de dos semanas o más; o
 - (iv) una vez cada día durante cinco días.
- 30 5. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el método comprende administrar dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica durante uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince ciclos.
- 35 6. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica es un conjugado químico.
- 40 7. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 6, en donde la porción de toxina diftérica de dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica está unida a través de un enlace covalente a la porción de IL-3 humana de dicho conjugado.
- 45 8. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica es una proteína expresada por vía recombinante.
9. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 8, en donde dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica se expresa como un único polipéptido que comprende los dominios catalíticos y de translocación de la toxina diftérica y la IL-3 humana.
- 50 10. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 9, en donde dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica se expresa en *E. coli*.
- 55 11. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 9 o 10, en donde dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica es una proteína de fusión que se expresa a partir de una secuencia codificante de proteína de fusión que incluye un codón de iniciación ATG.
- 60 12. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica comprende los dominios catalíticos y de translocación de la toxina diftérica fusionados a través de un conector peptídico a la IL-3 humana madura de longitud completa, en donde el conector peptídico tiene dos aminoácidos de longitud.
- 65 13. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 12, en donde dicho conector peptídico consiste en una Met y una His.
14. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 12, en donde dicho conector peptídico es un conector de Met-His.
15. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la secuencia de aminoácidos de dicha IL-3 humana madura de longitud completa es la secuencia de

aminoácidos de la forma madura de la IL-3 humana de acuerdo con el núm. de acceso de GenBank AAC08706, en donde la forma madura de la IL-3 humana carece del péptido señal.

- 5
16. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 9, en donde dicho conjugado de IL-3 humana-toxina diftérica comprende los residuos de aminoácidos 1 a 388 de la toxina diftérica unida a través de un enlace peptídico a IL-3 humana.
- 10
17. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el ser humano tiene citogenéticas anormales.
- 15
18. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el ser humano:
- (i) está en un estado de remisión del cáncer de células dendríticas plasmocitoides; o
 - (ii) presenta una recaída del cáncer de células dendríticas plasmocitoides;
 - (iii) le ha fracasado el tratamiento anterior del cáncer de células dendríticas plasmocitoides;
 - (iv) es refractario a otras terapias contra el cáncer de células dendríticas plasmocitoides;
 - (v) es susceptible a reacciones adversas de otras terapias contra el cáncer de células dendríticas plasmocitoides; o
 - (vi) no se ha tratado anteriormente contra el cáncer de células dendríticas plasmocitoides.
- 20
19. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el ser humano se ha tratado anteriormente con un agente quimioterapéutico convencional y/o ha recibido radioterapia.
- 25
20. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde al ser humano se le administra actualmente un agente quimioterapéutico convencional y/o recibe radioterapia.
- 30
21. La composición farmacéutica para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el ser humano es refractario a la quimioterapia.

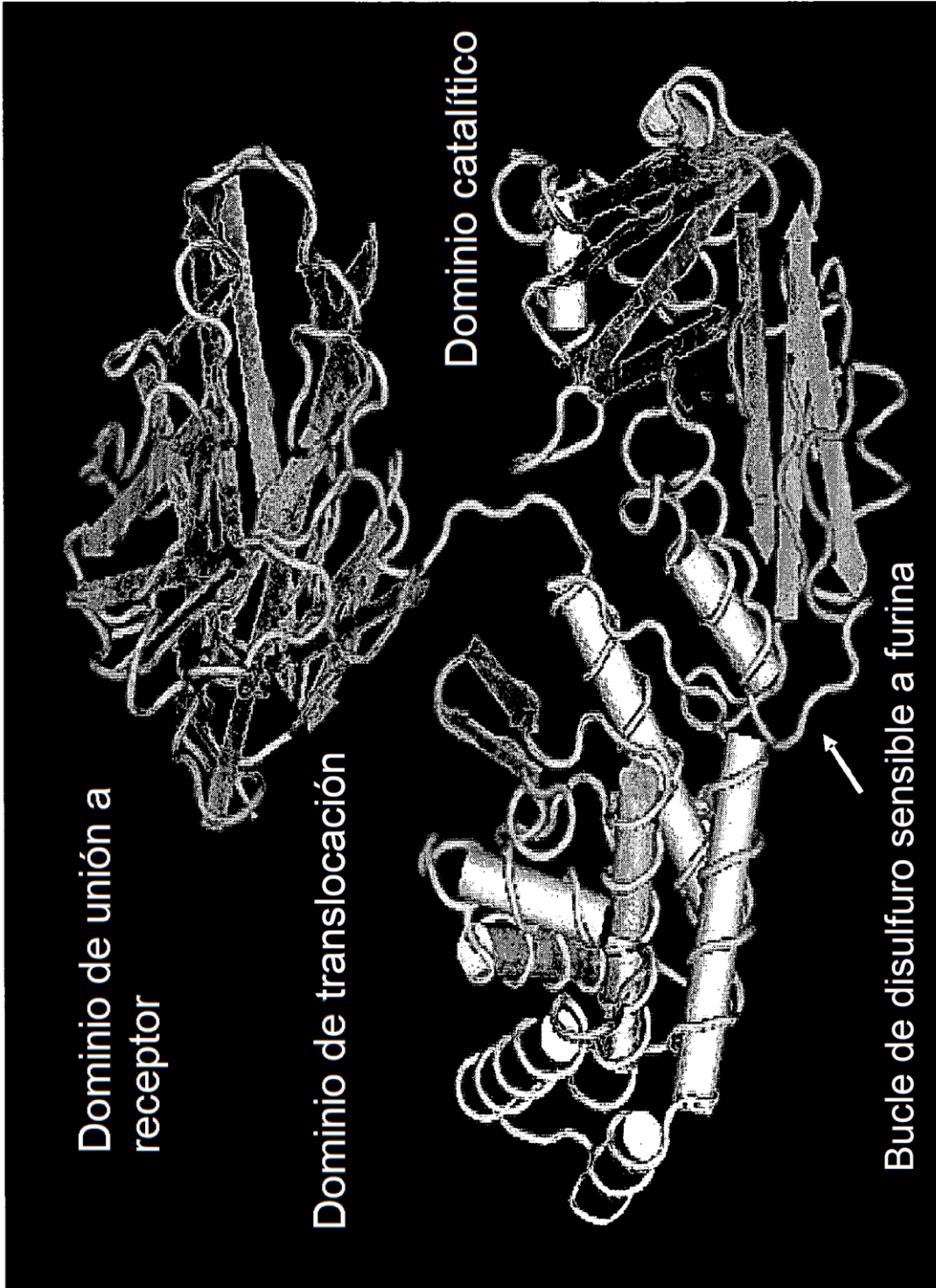


Fig. 1

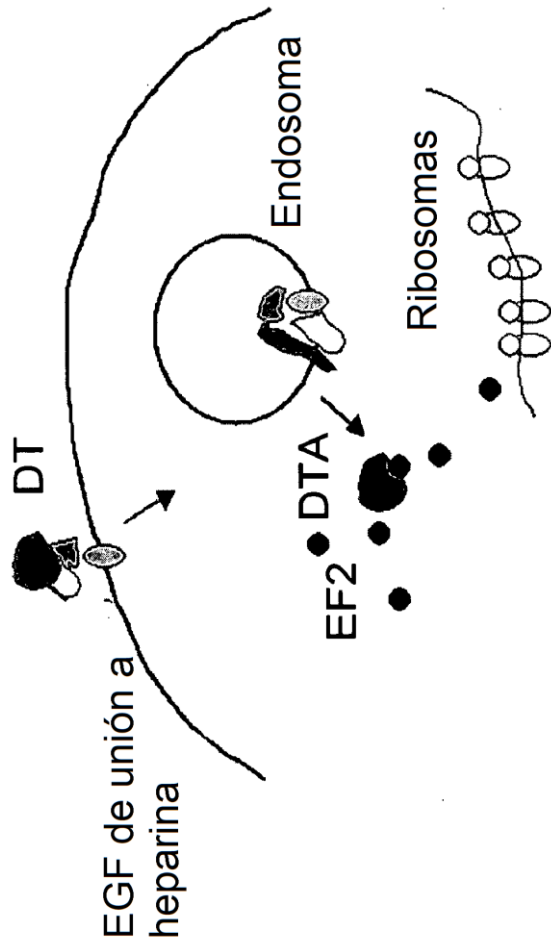


Fig. 2



Fig. 3

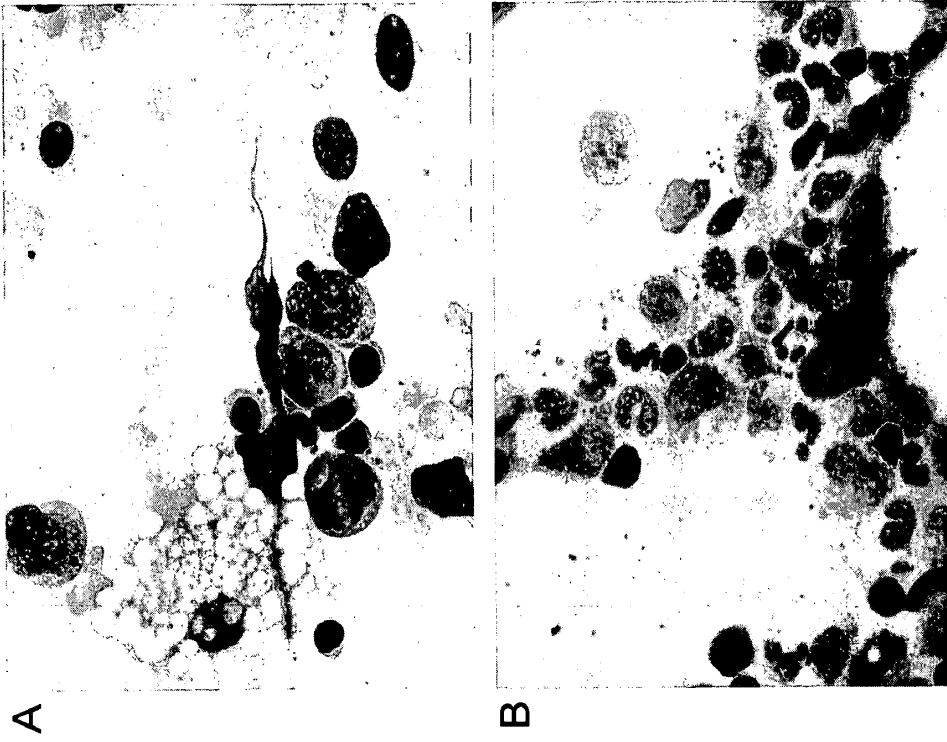


Fig. 4

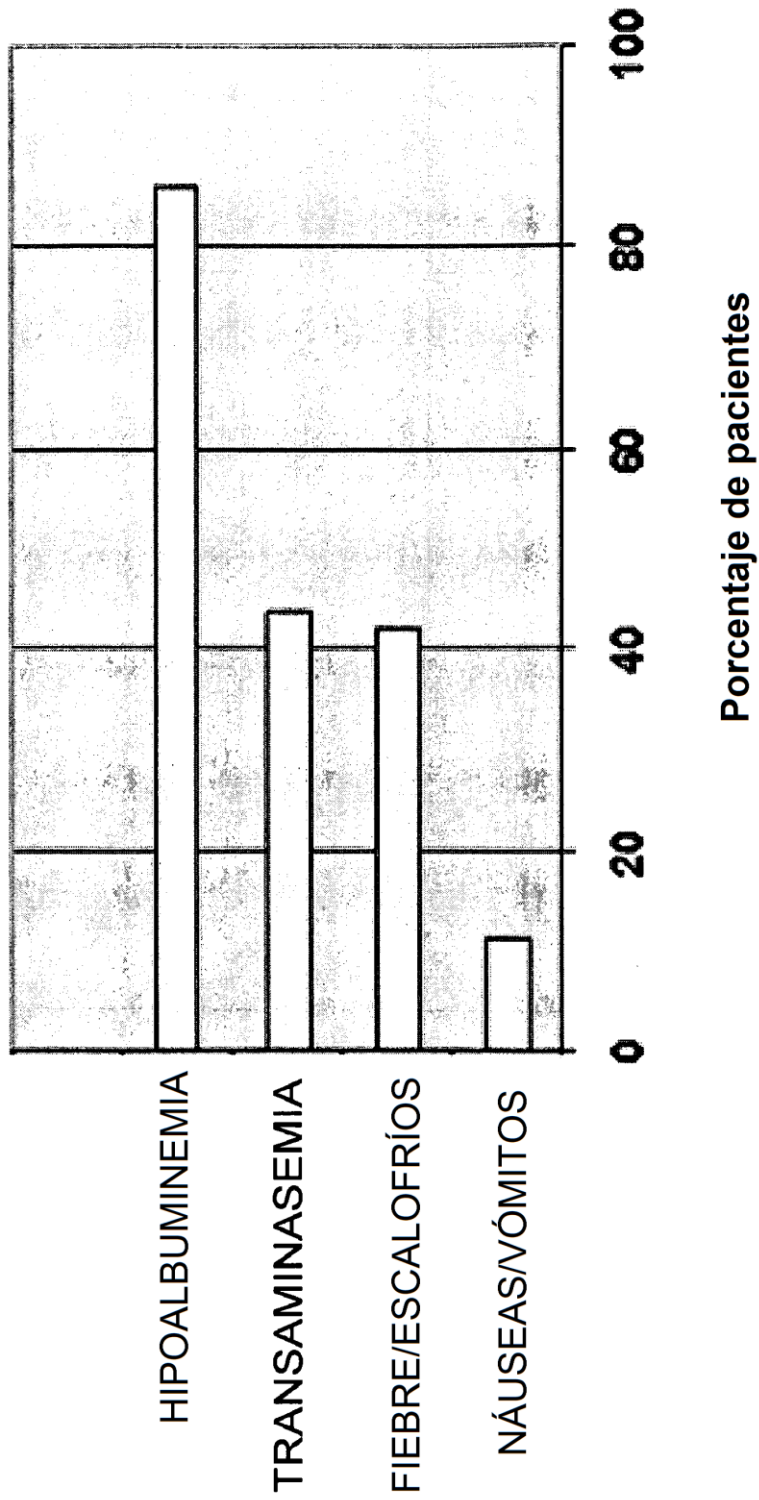
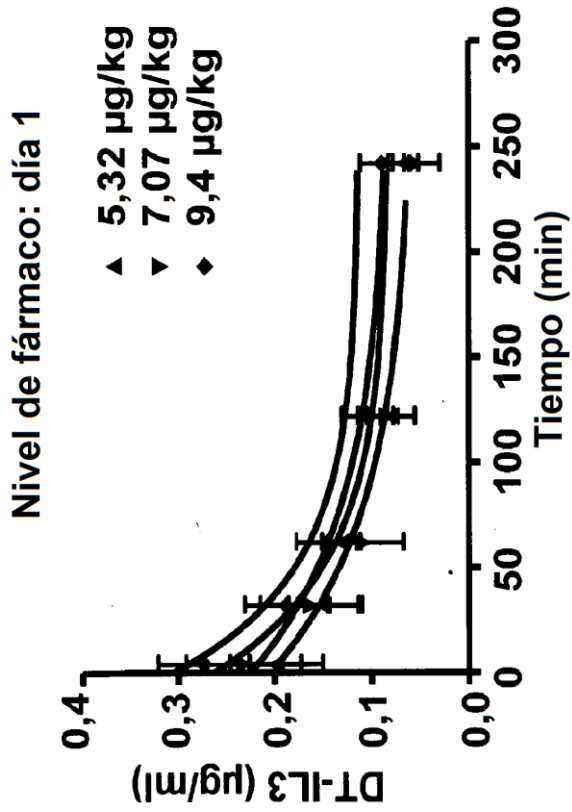
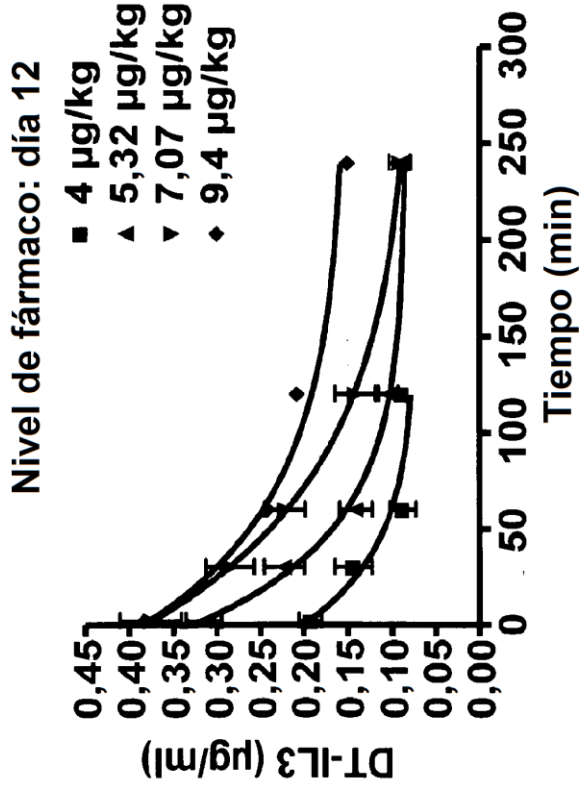


Fig. 5



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

Fig. 6A



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

Fig. 6B

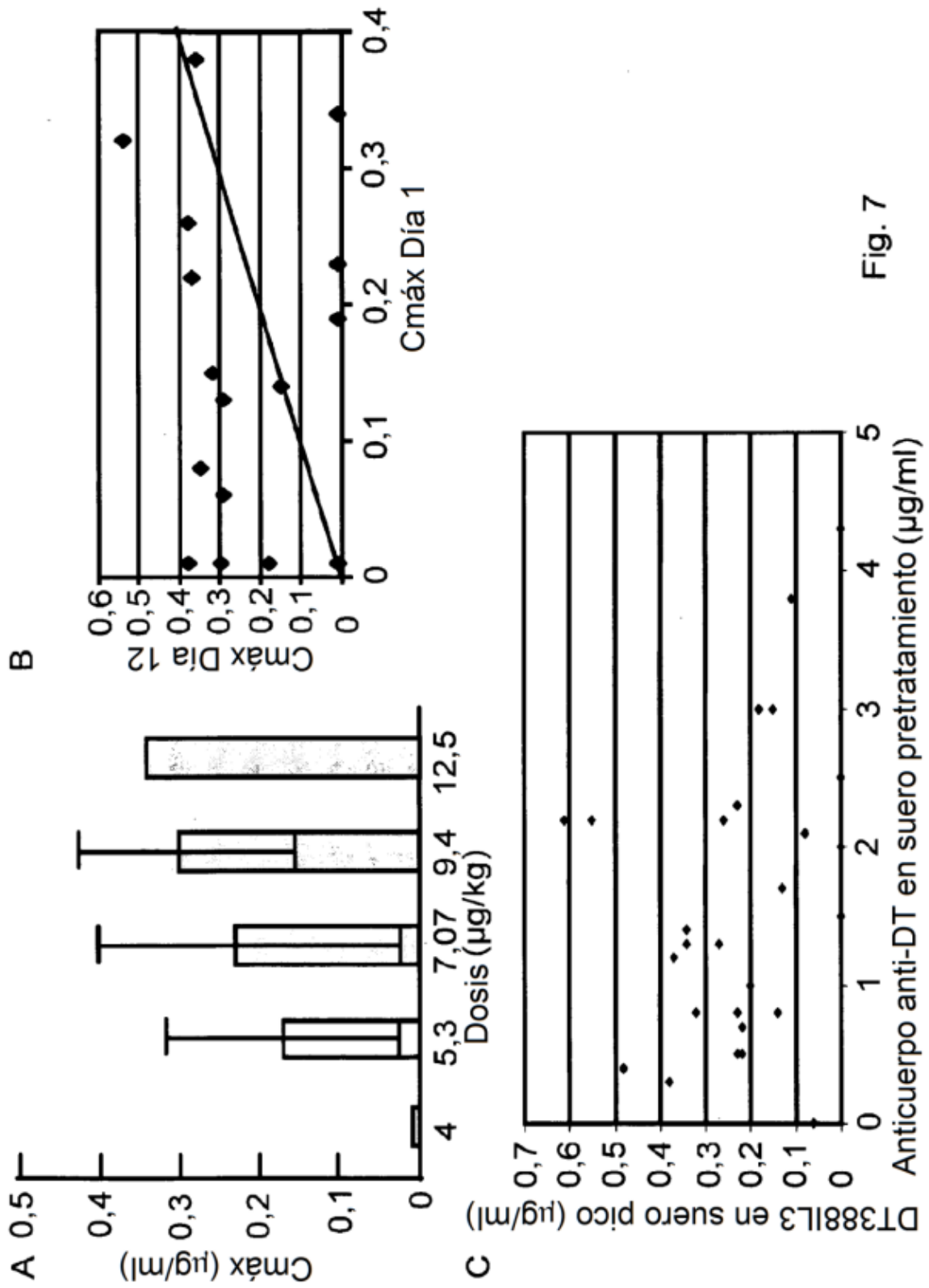


Fig. 7

POST



PRE

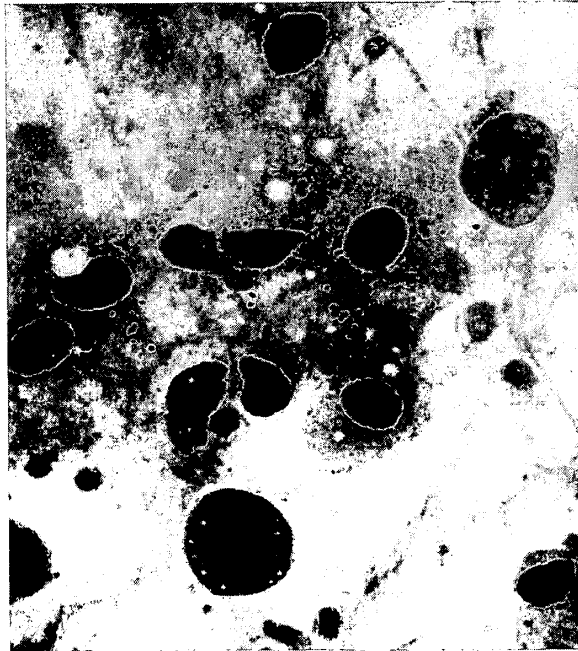


Fig. 8A

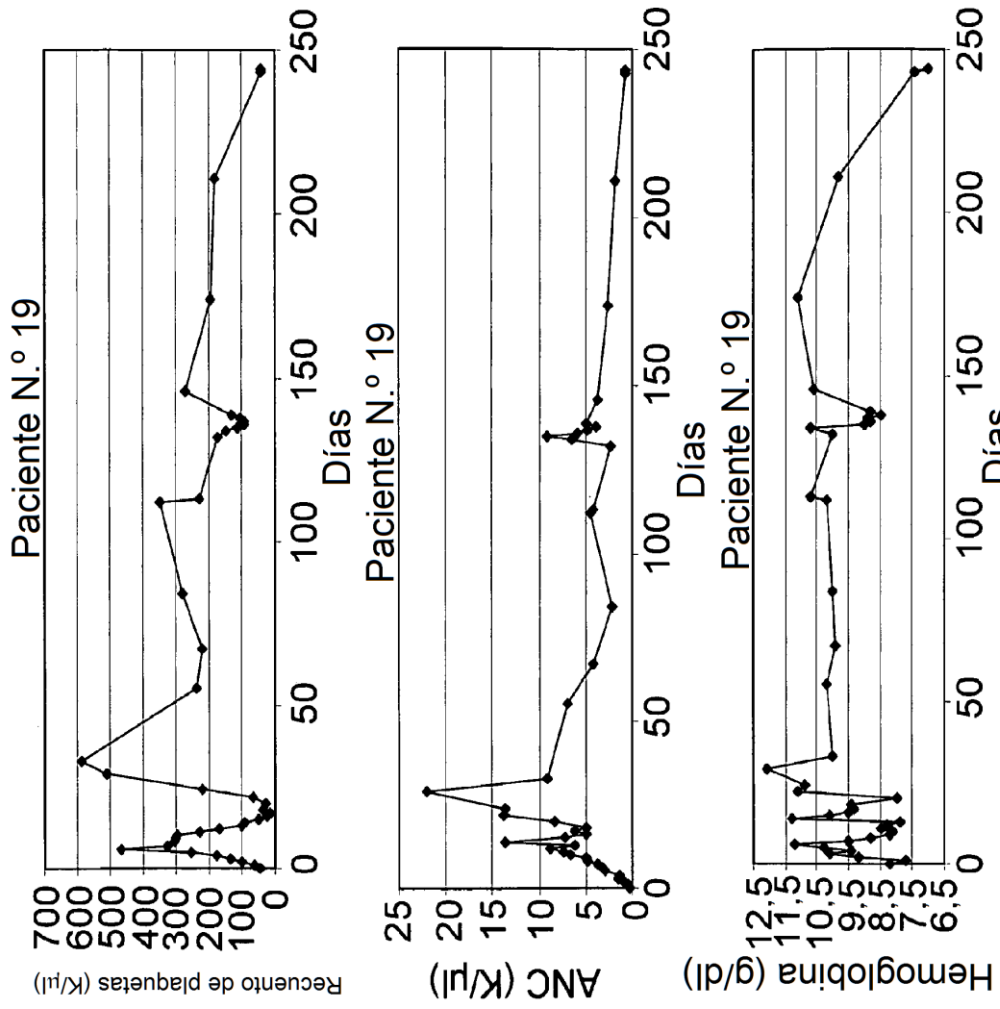
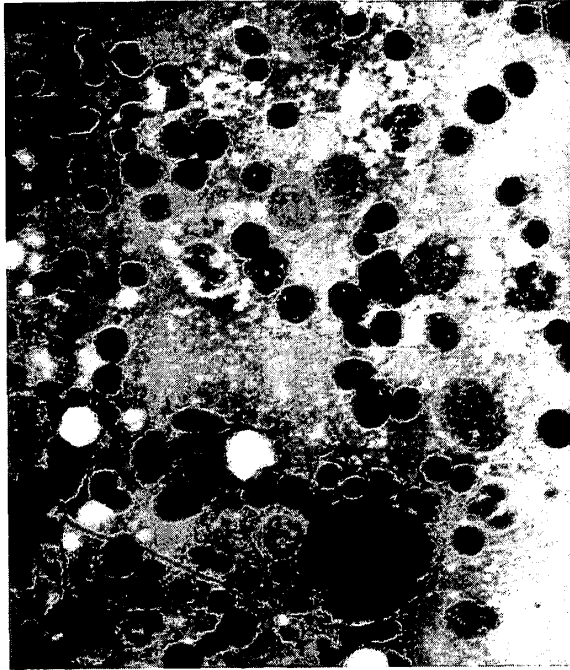


Fig. 8B

POST



PRE



Fig. 8C

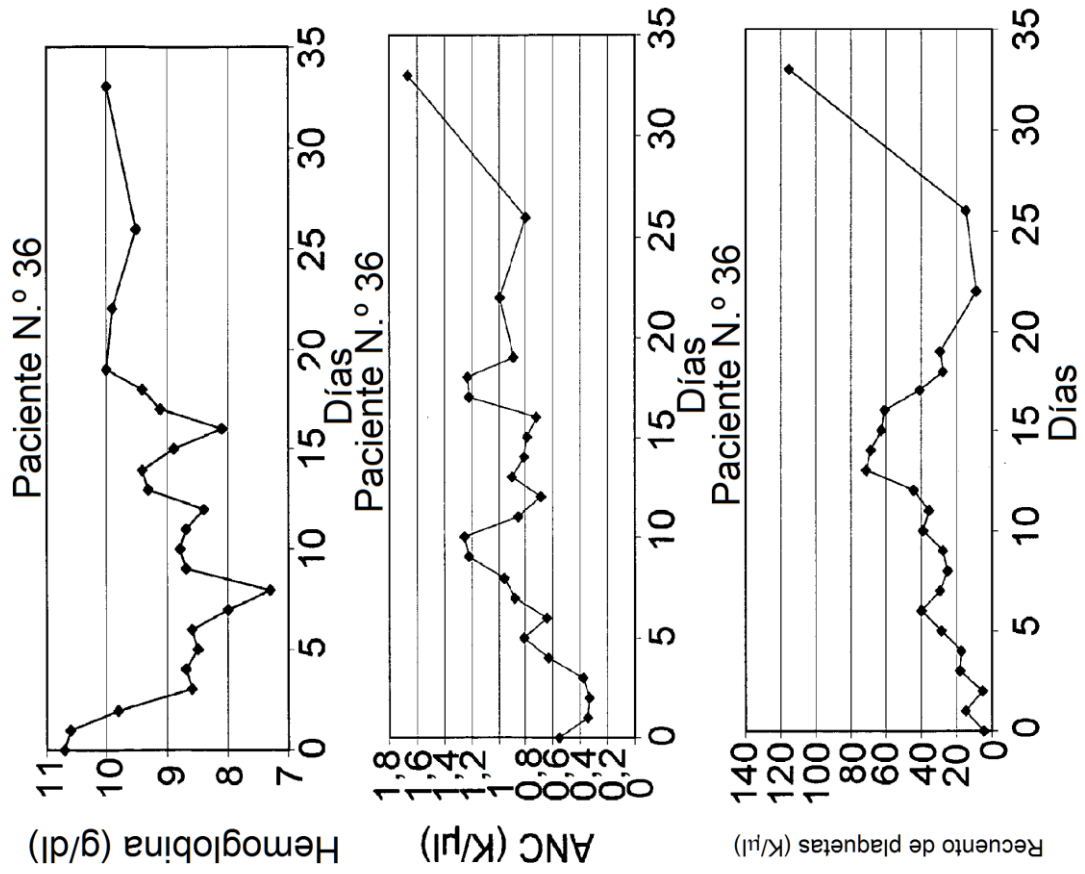


Fig. 8D