



No. 12-029410- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 15:41:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 86



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO TRATAMIENTO DE CÉLUAS TUMORALES DE
ASTROCITOS CON INHIBIDORES DE LOS RECPETORES DE
ENDOTELINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A01K 67/00

71. SOLICITANTE BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS
SYSTEM

DOMICILIO Texas, Estados Unidos de América

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 12-029410- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 15:41:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 86

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



No. 12-029410- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 15:41:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 86

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: BOARD OF REGENTS THE
UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

Dirección: 201 West 7th Street., Austin, Texas
78701, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: Texas, Estados
Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/044832 **Fecha** 09 de agosto de 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/019630 A3 **Fecha** 17 de febrero de 2011

6

TÍTULO (54) TRATAMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES DE ASTROCITOS CON
INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES DE ENDOTELINA.

7

Clasificación Internacional (51) A01K 67/00

8 **Prioridad**

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen
Estados Unidos de América

(32) Fecha
10 de agosto de 2009

(31) Número de Solicitud
61/232.687

9

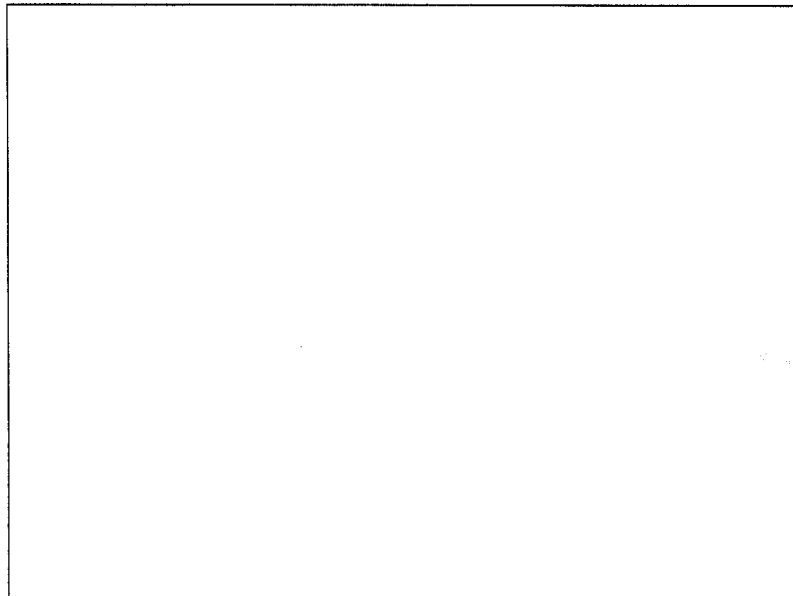
Comprobante de pago No. 12-12443 // 12-5383 // 12-12534 **Fecha** 07 de febrero de 2012.

10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXO

INVENTORES

1.) FIDLER, Isaiah, J.

(7515 S. Main Suite 490, Houston, Texas 77030, Estados Unidos de América);

2.) KIM, Sun-jin

(7515 S. Main Suite 490, Houston, Texas 77030, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0012443

Bogotá D.C., Febrero 07 de 2012 - 17:06:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450332912	07/02/2012	33.350.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	750.000.00	750.000.00
				\$750.000.00

SON: **SETECIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029410- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 15:41:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 86

000003

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 7 de 2012 - 17:06:12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 005383
		Bogotá D.C., Enero 20 de 2012 - 07:26:20

RECIBIDO DE : CLARKE MODET	NI 830.008.643
----------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411693251	17/01/2012	38.225.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1611 TASA ANUAL A#OS 4 a 8 PARA MANTENIMINETO DE PATENTE DE	310.000.00 310.000.00
			\$310.000.00
			=====

SON: **TRESCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-029410- -00000-0000
Fecha: 2012-02-20 15:41:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 86

000004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0012524
		Bogotá D.C., Febrero 07 de 2012 - 17:06:02

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450332912	07/02/2012	33.350.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10.000.00	10.000.00
				<u>\$10.000.00</u>

SON: **DIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-029410- -00000-0000

Fecha: 2012-02-20 15:41:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 86

000005

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Febrero 7 de 2012 - 17:06:15

COLOMBIA

Carrera 11 n° 86-53, Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 618 1088-Fax: (57 1) 6350824·Email:clarkemodet@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella) .
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

Barry D. Burgdorf

legal representative(s) of

Board of Regents, The University of Texas System

an organization existing under the laws of

State of Texas, United States of America

and in present execution of its business activity, domiciled at

211 West 7th St., Austin, Texas 78701

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following: **Regeneration of an Aqueous Solution From an Acid Gas Absorption Process by Multi-Stage Flashing and Stripping**

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; and to actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related matters, to receive the powers granted or in process of granting.
- 7) To ratify or not the officious agreement made to a la vista.
- 8) I (we) hereby appoint the aforementioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extra-judicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to request such substitutions.

Granted and signed at

on this 9 day of

Firma / signature

Signature

Barry D. Burgdorf

Vice Chancellor and General Counsel

000006

CERTIFICADO NOTARIAL

(Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los _____ días del mes de _____ de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____
_____ firmó de su puño
y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____
de la persona jurídica _____

4. La citada persona jurídica con sede en _____ está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____
_____ firmó en su presencia el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Cónsul de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acrediten tales circunstancias.

LEGALIZACIÓN POR EL CONSUL DE COLOMBIA
O POR APOSTILLA

NOTARIAL CERTIFICATE

(When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This 10th day of November, 2005
the undersigned Notary CERTIFIES that:
Barry D. Burgdorf

1. _____
(name of the person who signs the power of attorney)

of legal age and domiciled in Austin, Travis County, Texas

_____ set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of Vice Chancellor and General Counsel

of the juridical person Board of Regents, The University of Texas System

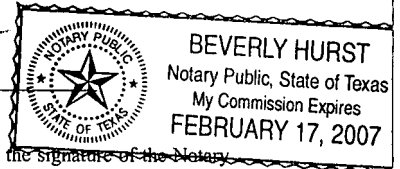
4. The mentioned juridical person with place of business in 211 West 7th St., Austin, Texas 78701

is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

Beverly Hurst
Notary Public



NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

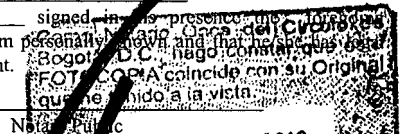
NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this _____ day of _____
the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

of legal age and domiciled at _____

_____ signed in my presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.



NOTA: Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consul or before who it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purpose is actually being accomplished, and 3) that the person or persons who grant the Power of Attorney are empowered to do it. The Consul will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.

LEGALIZATION BY THE COLOMBIAN CONSUL OR BY
APOSTILLE.

000007



2675

The State of Texas

Secretary of State

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document
2. has been signed by

BEVERLY HURST

3. acting in the capacity of Notary Public, State of Texas

4. and bears the seal/stamp of BEVERLY HURST, Notary Public, State of Texas, Commission Expires: 02-17-07

CERTIFIED

5. at Austin, Texas

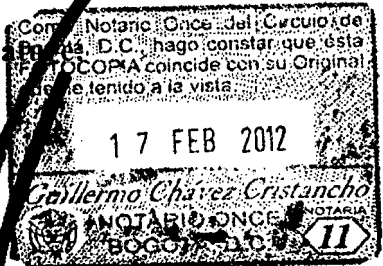
6. on December 23, 2005

7. by the Secretary of State of Texas

8. Certificate No. N-505731

9. Seal

10. Signature



Roger Williams

Roger Williams
Secretary of State

ST/lb • 000008



APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

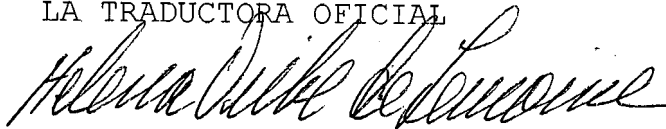
EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: BEVERLY HURST
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS.
4. LLEVA EL SELLO DE: BEVERLY HURST, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS, CON COMISION QUE EXPIRA EL 17/02/07.

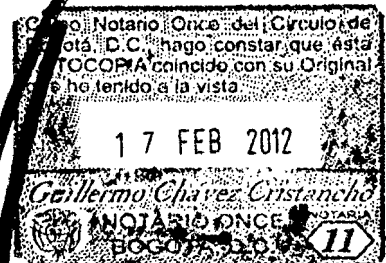
CERTIFICADO

5. EN: AUSTIN, TEXAS
6. EL: 23 DE DICIEMBRE, 2005
7. POR: EL SECRETARIO DE ESTADO DE TEXAS
8. BAJO EL NO.: N-505731
9. SELLO: GRAN SELLO DEL ESTADO DE TEXAS
10. FIRMA: ROGER WILLIAMS, SECRETARIO DE ESTADO

LA TRADUCTORA OFICIAL



HELENA URIBE DE LEMOINE



000009

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 ENF 6 A 11:03

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

402096
Helena Vake
CUMPLIMIENTO DE LA LEY
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Yo, el Notario, Once del Circulo de
Bogotá, D.C., hago constar que este
FOTOCOPIA coincide con su Original
que he tenido a la vista:
7 FEB 2012
Guillermo Chávez Cristancho
NOTARIO ONCE
BOGOTÁ D.C.

2675

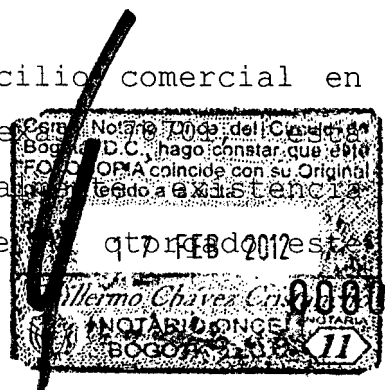
EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, LLEVA SELLO Y FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCION No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972

TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE APARECEN EN EL PODER OTORGADO POR BARRY D. BURGDORF, REPRESENTANTE LEGAL DE LA JUNTA DIRECTIVA DEL SISTEMA DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS, UNA ORGANIZACIÓN QUE EXISTE BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE TEXAS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, DOMICILIADA EN 211 WEST 7TH ST., AUSTIN, TEXAS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, A LAS DOCTORAS DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ. OTORGADO Y FIRMADO EN AUSTIN, TEXAS, EL 9 DE NOVIEMBRE DE 2005.-

CERTIFICADO NOTARIAL

El 10 DE NOVIEMBRE DE 2005 el suscrito Notario CERTIFICA que:

1. El Señor Barry D. Burgdorf, de edad legal y domiciliado en Austin, Condado de Travis, Texas, firmó de su puño y letra el documento que antecede.
2. Conoce al Otorgante, quien está legalmente capacitado para el otorgamiento.
3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de Vice Canciller y Asesor General de la persona jurídica Junta de Regentes del Sistema de la Universidad de Texas,
4. La citada persona jurídica con domicilio comercial en 211 West 7th Street, Austin, Texas, legalmente constituida, tiene actual existencia legal y que el acto para el cual se otorga este

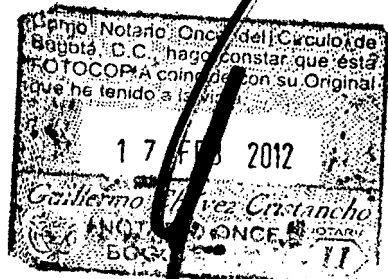


000010

poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El Otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que ésta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.
6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5 me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

FIRMADO POR: BEVERLY HURST, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS,
CON COMISION HASTA EL 7 DE FEBRERO, 2007.
HAY SELLO DEL NOTARIO.



Handwritten signature



000011

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

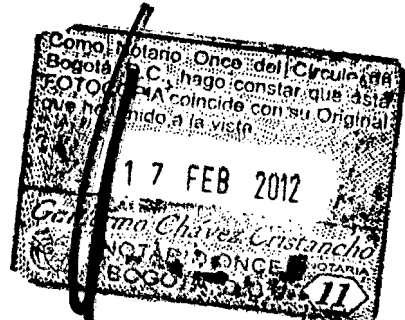
2. HA SIDO FIRMADO POR: BEVERLY HURST
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS.
4. LLEVA EL SELLO DE: BEVERLY HURST, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE TEXAS, CON COMISIÓN QUE EXPIRA EL 17/02/07.

CERTIFICADO

5. EN: AUSTIN, TEXAS
6. EL: 23 DE DICIEMBRE, 2005
7. POR: EL SECRETARIO DE ESTADO DE TEXAS
8. BAJO EL NO.: N-505731
9. SELLO: GRAN SELLO DEL ESTADO DE TEXAS
10. FIRMA: ROGER WILLIAMS, SECRETARIO DE ESTADO

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE



. 000012

RESUMEN

5 La divulgación se relaciona con un antagonista del receptor de endotelina para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebral en combinación con un agente quimioterapéutico citotóxico, radioterapia o ambos. El antagonista del receptor de endotelina, por ejemplo, puede ser macitentan o una mezcla de bosentan y macitenta,

10

15

20

TRATAMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES DE ASTROCITOS CON INHIBIDORES DE LOS RECEPTORES DE ENDOTELINA.

Antecedentes

5

La metástasis cerebral es uno de los retos más difíciles de enfrentar en oncología. Los tumores metastásicos son resistentes a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos. Los tratamientos para la metástasis cerebral son ante todo para la totalidad del cerebro y la radioterapia focalizada, con resección quirúrgica de los tumores en una minoría de casos. La mayoría de los regímenes quimioterapéuticos involucran 2-3 agentes tales como cisplatino, ciclofosfamida, etoposida, teniposida, mitomicin, irinotecan, vinorelbina, etoposida, fosfamida, temozolomida y fluorouracil (5-FU). Estos se administran en combinación con radioterapia. El efecto de estos quimioterapéuticos para prolongar la supervivencia generalmente es de menos de un año. Una quimioterapia bastante nueva para los tumores cerebrales es la temozolomida que se usa con irradiación en todo el cerebro. Los resultados son preliminares, pero la temozolomida parece tener un efecto limitado sobre la tasa de respuesta en comparación con la radioterapia sola y parece que tiene algún tipo de actividad clínica en combinación con radioterapia en ensayos de fase II.

20

A pesar de intensos esfuerzos, las limitadas opciones médicas disponibles para metástasis cerebrales se han mantenido pobres y a menudo más paliativas que terapéuticamente efectivas. Esta situación se ha reconocido desde hace tiempo, pero a la fecha, no se han materializado avances significativos. En consecuencia, hay una necesidad médica grande y vigente de nuevos enfoques terapéuticos y farmacéuticos efectivos en el tratamiento de metástasis cerebral.

25

. 000014

La divulgación discute más adelante los antagonistas de los receptores endotelina en relación con la metástasis cerebral. La Endotelina-1 (de aquí en adelante "ET-I"), un péptido vasoactivo, se produce principalmente en el endotelio, en el músculo liso vascular, y en la células epiteliales. La ET-I ejerce su efecto fisiológico vía dos receptores de alta afinidad acoplados a la proteína-G, los receptores Endotelina-A (de aquí en adelante "ET_A") y Endotelina-B (de aquí en adelante "ET_B"). Los antagonistas del Receptor Endotelina (ERAs) son una clase de compuestos bien establecida capaces de inhibir estos receptores de endotelina (de aquí en adelante "ETRs"). Dentro de esta clase hay subclases de antagonistas específicos para ET_A o ET_B y subclases efectivas contra ambos (especificidad dual). Un miembro de la subclase de especificidad dual, el bosentan, actualmente está aprobado para uso en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar.

Ciertos ERAs se han investigado para uso en la terapia del cáncer [Nelson JB, et al., Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*, 2008 Nov 1;113(9):2376-8.; Chiappori AA, et al. Phase I/II study of atrasentan, an ET_A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 2008 Mar 1; 14(5): 1464-9.] Estos estudios han excluido en gran medida a los pacientes con metástasis cerebral activa. *Ibid.* Esta exclusión se hace con base en la opinión general de que la metástasis cerebral existente no responde al tratamiento y, por lo tanto, la morbilidad y los síntomas debidos a estas metástasis enmascararían los efectos del tratamiento de prueba en el tumor primario. [Carden CP, et al., Eligibility of patients with brain metastases for phase I trials: time for a rethink? *The Lancet Oncology*, Vol 9, Issue 10, Pages 1012-1017, October 2008 doi: 10.1016/S1470-2045(08)70257-2.] Estos ensayos clínicos Estándar diseñan estrategias que sirven para enfatizar la expectativa general que las terapias efectivas contra

tumores primarios y aún de metástasis de tumores no cerebrales fallarán en el efecto sobre los tumores de metástasis cerebral.

Breve descripción de los dibujos

5

FIGURA 1: Cultivo *in vitro* de células (T) de cáncer de pecho MDA-MB-231 y astrocitos murine (A) se evaluaron por microscopia de barrido de electrones. Es evidente el contacto directo entre los astrocitos (que extienden las vainas de los pies) y las células tumorales;

10 **FIGURA 2:** Los co-cultivos de células cancerosas metastásicas de astrocitos muestran transferencia de color entre las células co-cultivadas

FIGURA 3: El cultivo de células humanas de cáncer de seno MDA-MB-231 o células humanas de cáncer de pulmón PC14Br4 con astrocitos (pero sin fibroblastos 3T3) reduce el índice de apoptosis relativo (resistencia aumentada) de las células tumorales
15 incubadas por 72 horas con paclitaxel (5 ng/ml) en $58.3 \pm 8.9\%$ (media $\pm$ S.D., $P < 0.01$) y $61.8 \pm 6.7\%$ (media $\pm$ S.D., $P < 0.05$), respectivamente (el índice de apoptosis se comparó mediante el ensayo de la t de Student);

FIGURA 4: Se cultivaron células solas de cáncer pulmonar humano PC14Br4 con
20 astrocitos (contacto directo célula a célula) en un medio que contiene glicoproteína-P asociada con Adriamicin (200 ng/ml), paclitaxel (5 ng/ml), vinblastina (3 ng/ml), vincristina (8 ng/ml), y glicoproteína-P disociada 5-FU (500 ng/ml) o cisplatino (2.4 μ g/ml);

25 **FIGURA 5:** La Protección mediada por astrocitos de células de metástasis cerebral a partir de la muerte celular inducida por quimioterapia citotóxica no dura más de 72 horas, después se pierde el contacto directo astrocito-células de metástasis cerebral.

. 000016

FIGURA 6: Se distinguen condiciones del perfil de transcripción genética entre murine y mRNA;

FIGURA 7: En las células MDA-MB-231, los genes 1069 y las células PC14Br4, los genes 594 se expresaron diferencialmente. Una comparación de la lista de dos genes revela expresión aumentada de varios genes bien conocidos por estar asociados con anti-apoptosis y supervivencia: glutatión S transferasa 5 (GSTA5), BCL2L1, TWIST;

FIGURA 8: La expresión de varios genes anti-apoptosis y de supervivencia se confirma en el nivel de proteína por el análisis Western blot;

FIGURA 9: Los datos de transcripción del gen se recogieron de dos ciclos de experimentos de co-cultivo;

FIGURA 10: Expresión aumentada de ETA-R en células humanas de cáncer de seno MDA-MB-231 co-cultivadas con astrocitos pero sin fibroblastos (3T3);

FIGURA 11: Expresión de pAKT por células humanas de cáncer de seno MDA-MB-231 co-cultivadas con astrocitos/Taxol;

FIGURA 12: El ACT-064992 agregado solo a células humanas de tumor de seno MDA-MB-231 o con astrocitos o fibroblastos 3T3 no produce ningún efecto citotóxico que se pueda medir;

FIGURA 13: El ACT-064992 agregado solo a células de cáncer de pulmón PC 14 o con astrocitos o con fibroblastos 3T3 no produce ningún efecto citotóxico que se pueda medir;

000017

FIGURA 14 AD: La inmunocoloración para ET_A R y ETBR en varios modelos de experimentos *in vivo* para cáncer metastásico de cerebro muestra expresión relativamente alta asociada específicamente con tumores y tejidos no normales de cerebro;

5

FIGURA 15: Terapia de combinación con paclitaxel y ACT-064992 sobre células humanas de cáncer de seno MDA-MB-231 co-cultivadas con astrocitos o con fibroblastos 3T3;

10 **FIGURA 16:** Terapia de combinación con paclitaxel y ACT-064992 sobre células humanas de cáncer de pulmón PC14Br4 co-cultivadas con astrocitos o con fibroblastos 3T3;

FIGURA 17: La adición de ACT-064992 a co-cultivos de astrocitos y células tumorales
15 inhibió la expresión de los factores de supervivencia pAKT y pMAPK;

FIGURA 18: Se fijaron secciones de cerebro y se tiñeron para visualizar la metástasis. Control (vehículo) (FIG. 18A); temozolomida ("TMZ") 10mg/kg p.o., diarios (FIG. 18B);
ACT- 064992 50 mg/kg, p.o. diarios (FIG. 18C); o combinación de TMZ + ACT-064992
20 (FIG. 18D); combinación de TMZ + ACT-064992 en mayor aumento (FIG. 18E);

FIGURA 19:

Se fijaron secciones de cerebro y se tiñeron para visualizar la metástasis. A. Control
25 (inyectado con una solución vehículo); B. Paclitaxel (8 mg/kg administrados intraperitonealmente una vez a la semana); C. ACT-064992 (50 mg/kg administrados oralmente una vez al día); y D. Combinación de ACT-064992 y paclitaxel;

FIGURA 20: Se tiñeron rebanadas de cerebro representativas de los cuatro grupos de tratamiento para CD31 (marcador de célula endotelial) y Ki67 (marcador de proliferación celular): A. ratones de control; B. ratones tratados con paclitaxel solamente; C. ACT-064992; D. paclitaxel y ACT-064992;

5

FIGURA 21: Se analizaron rebanadas de cerebro de los diferentes grupos de tratamiento *in situ* mediante deoxinucleotidil transferasa terminal dUTP nick extremo etiquetado (TUNEL): A. control; B. tratado con paclitaxel; C. tratado con ACT-064992; D. Combinación del ACT-064992 más paclitaxel;

10

FIGURA 22: Se inmunotiñeron rebanadas de los cerebros de los ratones de los cuatro grupos de tratamiento para ET_A (roja) y fosfoserina (verde) la co-localización produce color amarillo-naranja. A. Cerebro control; B. cerebro de ratones tratados con paclitaxel; C. cerebro de ratones tratados con ACT-064992 solo; D cerebro de ratones tratados con ACT-064992 + paclitaxel.

15

Descripción detallada

Definiciones.

20

Como se utiliza en este documento, el uso de la palabra "un" o "una" cuando se emplea junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno", pero esto también es consistente con el significado de "uno o más," "por lo menos uno," y "uno o más de uno", además los términos "que tiene", "que contiene", "que incluye" y "que comprende" son intercambiables y alguien versado en el arte es consciente que estos términos son términos de composición abierta.

25

• 000015

Los términos “Tratar” y “tratamiento” como se usan aquí se refieren a administrar a un individuo una intervención médica terapéuticamente efectiva, tal como quimioterapia, de tal manera que el individuo tiene una mejora en los parámetros relacionados con el cáncer. La mejora es cualquier mejoría observable o medible incluyendo cambios en el tamaño del tumor canceroso, reducción en la tasa de crecimiento del tumor canceroso, o medidas subjetivas u objetivas del dolor asociado con el tumor canceroso. Por lo tanto, alguien versado en el arte se dará cuenta que un tratamiento puede mejorar la condición del paciente pero puede no ser una curación completa de la enfermedad.

El término "cantidad efectiva" o "cantidad efectiva terapéuticamente" como aquí se usa se refiere a una cantidad que produce una mejora o alivio de los síntomas de la enfermedad o condición.

El término "tumor existente de metástasis de cerebro" como aquí se usa se refiere a un tumor multicelular de cerebro y a la metástasis cerebral rodeada por, e infiltrada con astrocitos GFAP-positivos. Los tumores metastásicos de cerebro existentes son de dos tipos distintos clínicamente, micrometastásicos, que además son pequeños para ser visualizados por medios radiológicos, y metastásicos visibles, que son aquellos tumores suficientemente grandes para ser detectados por medios radiológicos clínicos, tales como imágenes de resonancia magnética, tomografía computarizada, o tomografía por emisión de positrones. Estas lesiones metastásicas son distintas de las células de cáncer metastásico en la circulación sistémica y de las células de cáncer solas que se extravasan en el tejido cerebral o que residen en él quiescentemente. [Ver, de manera general Johanna A. Joyce & Jeffrey W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis, Nat Rev Cancer 9, 239-252 (April 2009) | doi: 10.1038/nrc2618.]

"Micrometástasis" como se usa en este documento se define preferiblemente como un grupo de células cancerosas confluentes que mide más de 0.2 mm y/o que tiene más de 200 células en una anchura máxima de 2 mm. Más preferiblemente "Micrometástasis" se define como un grupo de células cancerosas confluentes de 0.2

000020

mm a 2 mm en anchura máxima. Ver. The AJCC Cancer Staging Manual and Handbook, 7th ed. (2010), Edge, S.B.; Byrd, D.R.; Compton, CC; Fritz, A.G.; Greene, F.L.; Trotti, A. (Eds.), ISBN: 978-0-387-88440-0. Una definición alternativa preferida de "micrometástasis" es un grupo confluyente de por lo menos 1000 células cancerosas y por lo menos 0.1 mm de dimensión en anchura hasta 1 mm de dimensión en anchura. La micrometástasis normalmente no es visible en imágenes estándar de MRI con contraste o con otras técnicas de imágenes clínicas. Sin embargo, en ciertos cánceres, los anticuerpos radiactivos dirigidos a los antígenos selectivos para el tumor (e.g. Her2 para metástasis de cáncer de seno) permiten la visualización de micrometástasis. Otros métodos indirectos de detección incluyen medios de contraste de fugas en los sitios de micrometástasis cerebral debidos a fugas vasculares inducidas por VEGF. Yano S; et al. (2000), Expression of vascular endothelial growth factor is necessary but not sufficient for production and growth of brain metastasis. Cancer research 2000; 60(17):4959-67. También se pueden aplicar técnicas más sensibles de imágenes para detectar micrometástasis. Por ejemplo, el volumen de sangre se puede establecer en imágenes MRI usando un agente de contraste alternativo USPIO (Molday Iron, Biopal, Worcester, MA, vendido como Molday IONTM) para detectar micrometástasis. Juan Yin J, et al., la Imagenología no invasiva de los efectos funcionales de la terapia anti-VEGF sobre la extravasación del tumor y el volumen de sangre regional en un modelo experimental de metástasis cerebral. Clin Exp Metastasis. 2009;26(5):403-14. Epub 2009 Mar 11.

El término "protección mediada por astrocito " como se usa aquí se refiere a la capacidad de un astrocito para reducir la citotoxicidad de un producto químico para otro tipo de célula en contacto físico directo con el astrocito. Este contacto físico incluye astrocitos conectados a células cancerosas, en particular vía comunicación por unión en hendidura (GJC).

- 000021

El término "muerte celular inducida por quimioterapia citotóxica " como se usa aquí se refiere a la inducción de la apoptosis o muerte celular necrótica por un químico citotóxico. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos usados medicamente funcionan matando las células tumorales que se dividen rápidamente de esta manera.

5

El término "antagonista del receptor de endotelina " como se usa aquí se refiere a la clase de compuestos reconocidos en el arte como tales y en particular a un compuesto que, cuando se somete al "Test para la determinación de ET_A o ET_B IC₅₀" descrito en la presente solicitud de patente, tiene un IC₅₀ igual o más bajo que 1 µM contra ET_A,

10 contra ET_B o contra ambos ET_A y ET_B. Un ERA es un medicamento que bloquea los receptores de endotelina de interacción con ET-I o evita un ETR a partir de la respuesta al ET-I ligado. Existen dos clases principales de ERAs: ERAs selectivos, tal como sitaxentan, ambrisentan y atrasentan, que afectan los receptores ET, y ERAs duales, tal como bosentan, que afectan a ambos receptores, al receptor ET_A y al ET_B. Miembros
15 ejemplo de la clase compuestos ERA se pueden encontrar en la literatura de Patente citada en [HAM Mucke "Small- molecule endothelin receptor antagonists: A review of patenting activity across therapeutic areas" IDrugs 2009 12:366-375.] Los ERAs representativos que ya han sido investigados con ensayos clínicos en humanos o
20 aprobados para uso médico incluyen sitaxentan, tezosentan, clazosentan, abbrisentan, bosentan, macitentan (también conocido como ACT-064992) y/o atrasentan.

El término "antagonista ET_A " como se usa aquí se refiere a un compuesto que, cuando se somete al "Test para la determinación de ET_A o ET_B IC₅₀" descrito en la presente solicitud de patente, tiene un IC₅₀ igual o más bajo que 1 µM contra ET_A.

25

El término "antagonista ET_B " como se usa aquí se refiere a un compuesto que, cuando se somete al "Test para la determinación de ET_A o ET_B IC₅₀" descrito en la presente solicitud de patente, tiene un IC₅₀ igual o más bajo que 1 µM contra ET_B.

000022

El término "antagonista dual del receptor de endotelina " o "dual ERAs" como se usa aquí se refiere a un compuesto que, cuando se somete al "Test para la determinación ET_A o ET_B IC_{50} " descrito en la presente solicitud de patente, tiene un IC_{50} igual o más bajo que 1 μM contra ET_A y un IC_{50} igual o más bajo que 1 μM contra ET_B . Los ERAs duales incluyen bosentan y macitentan.

El término "agente quimioterapéutico citotóxico " como se usa aquí se refiere a una sustancia que induce la apoptosis o muerte celular necrótica. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos citotóxicos que se pueden usar en combinación con ERAs de acuerdo con la presente invención incluyen:

- agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, clorambucil, ciclofosfamida, fosfamida, streptozocin, carmustina, lomustina, melfalan, busulfan, dacarbazina, temozolomida, tiotepa o altretamina);
- drogas de platino (por ejemplo cisplatino, carboplatino u oxaliplatino);
- drogas antimetabolito (por ejemplo 5-fluorouracil, capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina o pemetrexed);
- antibióticos anti tumor (por ejemplo daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, actinomycin-D, bleomicina, mitomicina-C o mitoxantrona); y
- inhibidores mitóticos (por ejemplo paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina o estramustina); y
- inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo etoposida, teniposida, topotecan, irinotecan, diflomotecan o elomotecan).

"Súper-sensibilización" o "súper-sensibilizar" se define como un aumento relativo en la muerte celular causado por agente(s) quimioterapéuticos citotóxicos en contacto físico con astrocitos por encima, que se observa en las células bien sea en ausencia de astrocitos o con contacto físico no directo con los astrocitos.

• 000023

"Simultáneamente" o "simultáneo", cuando se refiere al uso terapéutico, significa en la presente solicitud que el uso terapéutico concerniente consiste en la administración de dos o más ingredientes activos por la misma ruta y al mismo tiempo.

5

"Separadamente" o "separado, cuando se refiere al uso terapéutico, significa en la presente solicitud que el uso terapéutico concerniente consiste en la administración de dos o más ingredientes activos aproximadamente al mismo tiempo mediante por lo menos dos rutas diferentes.

10

Por administración terapéutica "durante un periodo de tiempo " se entiende en la presente solicitud la administración de dos o más ingredientes en diferentes momentos, y en particular un método de administración de acuerdo con el cual la administración total de uno de los ingredientes activos se completa antes que comience la administración del otro o de los otros. De esta manera es posible administrar uno de los ingredientes activos por varios días, semanas o meses antes de administrar el otro ingrediente o ingredientes activos. En este caso, la administración ocurre no simultánea.

15

Divulgación

20

En el parénquima cerebral, la función de los astrocitos de mantener la homeostasis está bien reconocida.

25

Los astrocitos envuelven todos los vasos sanguíneos con pies terminales especializados y se comunican con otras células cerebrales, tales como las neuronas. Esta estructura única le permite a los astrocitos transportar los nutrientes esenciales, tales como glucosa y aminoácidos, desde la circulación hasta las neuronas dependientes, y recientemente se demostró que la glicolisis en los astrocitos regula la

. 000024

actividad neuronal, el así llamado "acoplamiento metabólico neurona-astrocito." Bajo condiciones patológicas tales como, hipoxia, isquemia, y condiciones degenerativas, los astrocitos se activarán y expresarán una proteína designada como GFAP. Se ha demostrado que la proteína GFAP reactiva de los astrocitos protege las neuronas de

5 varios retos y rescata las neuronas de la excitotoxicidad producida por la acumulación de glutamato. Los astrocitos activados también pueden proteger las neuronas de la apoptosis producida por el etanol, peróxido de hidrógeno, y la citotoxicidad catalizada por cobre de la cisteína.

10 La metástasis clínica cerebral comúnmente está rodeada e infiltrada por astrocitos activados (GFAP- positivos). [Yoshimine T, et al. (1985) Immunohistochemical study of metastatic brain tumors with astroprotein (GFAP), a glia-specific protein. Tissue architecture and the origin of blood vessels. J Neurosurg 62: 414-418.]. Los inventores han confirmado este fenómeno, que se reproduce en un modelo de xenotrasplante más

15 adelante.

En adelante se presentan varias implementaciones de la presenta invención:

1) La invención primeramente se relaciona con un antagonista del receptor de endotelina para uso en la prevención o tratamiento de metástasis cerebral en

20 combinación con un agente quimioterapéutico citotóxico, radioterapia o ambos.

2) De acuerdo con una variante principal de la implementación 1), el antagonista del receptor de la endotelina para uso en combinación con un agente quimioterapéutico citotóxico.

25

3) De acuerdo con una sub-implementación de la implementación 2), el agente quimioterapéutico citotóxico comprenderá (y en particular es) un agente alquilante.

. 000025

4) En particular, el agente alquilante de la implementación 3) se seleccionará del grupo que consiste de mecloretamina, clorambucil, ciclofosfamida, fosfamida, streptozocin, carmustina, lomustina, melfalan, busulfan, dacarbazina, temozolomida, taiotepa y
5 altretamina.

5) De acuerdo con otra sub-implementación de la implementación 2), el agente quimioterapéutico citotóxico comprenderá (y en particular es) un medicamento de platino.

10

6) En particular el medicamento de platino de la implementación 5) se seleccionará del grupo que consiste de cisplatín, carboplatín y oxaliplatín.

7) De acuerdo aún con otra sub-implementación de la implementación 2), el agente quimioterapéutico citotóxico comprenderá (y en particular es) un medicamento anti-
15 metabolito.

8) En particular, el medicamento anti-metabolito de la implementación 7) se seleccionará del grupo que consiste de 5-fluorouracil, capecitabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina y pemetrexed.

20

9) De acuerdo aún con otra sub-implementación de la implementación 2), el agente quimioterapéutico citotóxico comprenderá (y en particular es) un antibiótico antitumor.

10) En particular, el antibiótico antitumor de la implementación 9) se seleccionará del
25 grupo que consiste de daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, actinomycin-D, bleomicin, mitomicin-C y mitoxantrona.

000026

11) De acuerdo con otra sub-implementación de la implementación 2, el agente quimioterapéutico citotóxico comprenderá (y en particular es) un inhibidor mitótico.

12) En particular, el inhibidor mitótico de la implementación 11) se seleccionará del grupo que consiste de paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina y estramustina.

13) De acuerdo aún con otra sub-implementación de la implementación 2), el agente quimioterapéutico citotóxico comprenderá (y en particular es) un inhibidor de la topoisomerasa II.

10

14) En particular, el inhibidor de la topoisomerasa II de la implementación 13) se seleccionará del grupo que consiste de etoposida, teniposida, topotecan, irinotecan, diflomotecan y elomotecan.

15) En una sub-implementación preferida de la implementación 2) el agente quimioterapéutico citotóxico comprenderá paclitaxel, doxorubicin, vinblastina, vincristina, 5-fluorouracil, cisplatino, ciclofosfamida, etoposida, teniposida, mitomicina-C, irinotecan, vinorelbina, ifosfamida y temozolomida (y en particular de paclitaxel y temozolomida).

16) En particular, el agente quimioterapéutico citotóxico de la implementación 15) se seleccionará de paclitaxel, temozolomida y a una mezcla de paclitaxel y temozolomida.

17) De acuerdo con una variante preferida de la implementación 16), el antagonista del receptor de la endotelina de la implementación 16) se seleccionará del grupo que consiste de bosentan, macitentan y una mezcla de macitentan y bosentan (y en particular será macitentan).

000027

18) La invención también se relaciona con un antagonista del receptor de la endotelina para uso en combinación con por lo menos uno de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos mencionados en una de las implementaciones 2) a 17) y con radioterapia.

19) De acuerdo con una implementación preferida de esta invención, el antagonista del receptor de la endotelina usado en las implementaciones 1) a 18) comprenderá (y en particular es) un antagonista dual del receptor de endotelina.

20) En particular, el antagonista dual del receptor de endotelina de la implementación 19) se seleccionará del grupo que consiste de bosentan, macitentan y una mezcla de bosentan y macitentan.

21) En una implementación particularmente preferida, el antagonista dual del receptor de endotelina de la implementación 20) será macitentan.

22) De acuerdo con una variante de las implementaciones 1) a 21), el antagonista del receptor de endotelina y el agente quimioterapéutico citotóxico se administrarán separadamente.

23) De acuerdo con otra variante de las implementaciones 1) a 21), el antagonista del receptor de endotelina el agente quimioterapéutico citotóxico se administrarán simultáneamente.

24) De acuerdo con aún otra variante de las implementaciones 1) a 21), el antagonista del receptor de endotelina y el agente quimioterapéutico citotóxico se administrarán durante un período de tiempo.

25) De acuerdo con aún otra variante de la implementación 1) el antagonista del receptor de endotelina será para uso en combinación con radioterapia (por lo que esta radioterapia es preferiblemente radioterapia cerebral total o radiocirugía estereotáctica).

5 26) De acuerdo con una implementación preferida de esta invención, el antagonista del receptor de endotelina usado en la implementación 25) comprenderá (y en particular es) un antagonista dual del receptor de endotelina.

27) En particular el antagonista dual del receptor de endotelina de la implementación
10 26) se seleccionará del grupo que consiste de bosentan, macitentan y una mezcla de bosentan y macitentan.

28) En una implementación particularmente preferida, el antagonista dual de los receptores de endotelina de la implementación 27) será macitentan.

15 29) En otra variante principal de esta invención, el antagonista del receptor de endotelina, para uso con un agente quimioterapéutico citotóxico de acuerdo con una de las implementaciones 2) a 23) será para usarlo junto con radioterapia (con lo cual esta radioterapia es preferiblemente para todo el cerebro o radiocirugía estereotáctica).

20 30) Otra variante principal de esta invención, combinable con una o más de las implementaciones anteriores 1) a 29), es un antagonista del receptor de endotelina para usarlo en el tratamiento de un tumor metastásico de cerebro que existe en un individuo en dónde el tumor metastásico existente en el cerebro es un tumor micrometastásico tal
25 como un tumor micrometastásico seleccionado del grupo que consta de cáncer de pulmón, cáncer de seno, cáncer de colon, melanoma o carcinoma renal o tumor micrometastásico cerebral.

. 000029

31) La invención también se refiere a un método de inhibición de la protección mediada por un astrocito de células de metástasis cerebral, este método comprende administrar una cantidad efectiva de un antagonista el antagonista del receptor de endotelina a las células metastásicas del cerebro y el astrocito para inhibir la protección mediada por astrocitos.

32) La invención también se refiere además al método de la implementación 31), el cual además comprende administrar una cantidad efectiva de al menos un agente quimioterapéutico citotóxico a las células metastásicas cerebrales.

33) La invención además se refiere al método de la implementación 31), el cual además, comprende someter las células de metástasis del cerebro a radioterapia (dónde ésta radioterapia es preferiblemente radioterapia de todo el cerebro o radiocirugía estereotáctica).

34) La invención por otra parte se refiere al método de la implementación 31), la cual además comprende administrar una cantidad efectiva de al menos un agente quimioterapéutico citotóxico a las células de metástasis del cerebro y someter a las células de metástasis del cerebro a radioterapia (dónde ésta radioterapia es preferiblemente radioterapia de todo el cerebro o radiocirugía estereotáctica).

35) La invención además se refiere a un método de fabricación de un medicamento para uso de acuerdo con cualquiera de los anteriores 1) a 34) y combinaciones de estos. Preferiblemente, el medicamento producido por lo anterior está además empacado en un empaque comercial con instrucciones para llevar a cabo una o más de 1)-34), y cualquier combinación de éstos.

36) La invención además se refiere a un antagonista del antagonista del receptor

000030

de endotelina para uso en la reducción del riesgo de y/o reducir la tasa de expansión de la metástasis cerebral, incluyendo micrometástasis cerebral, en combinación con un agente quimioterapéutico citotóxico, radioterapia o ambos de acuerdo con una o más de 1)-34), y cualquier combinación de éstos.

5

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Experimento 1 – Análisis por inmunofluorescencia de metástasis cerebral.

Materiales y métodos.

- 10 La metástasis experimental de cerebro se produjo por inyección de células PC14Br4 de adenocarcinoma pulmonar humano en la arteria carótida interna de ratones desnudos (S1). Los ratones se sacrificaron 5 semanas más tarde y se procesaron las muestras de tejido en el compuesto OCT para en una sección congelada como se describió previamente (S2). Los tejidos se seccionaron (8-10 μ m), y se montaron sobre placas
- 15 cargadas positivamente, y se secaron al aire durante 30 minutos. La fijación del tejido se llevó a cabo usando un protocolo que consiste de tres inmersiones secuenciales en soluciones de acetona enfriada con hielo, 50:50 (v/v) acetona: cloroformo, y acetona (5 minutos cada una). Las muestras se lavaron tres veces con PBS, se incubaron con solución de proteína de bloqueo que contiene 5% de suero normal de caballo y 1% de
- 20 suero normal de cabra en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego se incubaron con una dilución 1:400 de anticuerpos policlonales anti-GFAP de conejo (Biocare Medical, Concord, CA) durante 18 horas a 4°C. Las muestras se lavaron cuatro veces con PBS por 3 minutos cada una y luego se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:1500 de anticuerpo Cy5 anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch
- 25 Laboratories, West Grove, PA). Las muestras de control se etiquetaron con una concentración idéntica de control de anticuerpos isotipo y anticuerpos Cy5 anti-conejo de cabra. Todas las muestras se lavaron y luego se incubaron por poco tiempo con colorante sytox verde de ácido nucleico (Eugene, OR). Las placas se montaron con una

000031

solución que contenía glicerol/PBS de 0.1 mol/L de propil galato (Sigma) para minimizar la decoloración de la fluorescencia. Se colectaron imágenes confocales en un sistema de microscopio Zeiss LSM 510 de escaneo por laser (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) equipado con un microscopio Axioplan motorizado, laser de argón, laser de HeNe, control LSM 510 y software de adquisición de imágenes y los filtros (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT).

Se construyeron las imágenes compuestas con el programa Photoshop (Adobe Systems, Inc., Mountain View, CA).

Resultados

Los resultados se determinaron a partir de las imágenes a color (no se muestran), de muestras que reaccionaron inmunohistoquímicamente. Las células del tumor se rodearon con y se infiltraron con astrocitos GF-AP positivo (rojo). Este experimento confirmó las observaciones anteriores de la infiltración de astrocitos de muestras clínicas de metástasis en cerebro. La misma infiltración por astrocitos GF-AP positivos se observó con un modelo de ratón murine singénico. El análisis inmunohistoquímico de carcinoma Lewis de pulmón de ratón (3LL) en el cerebro de un ratón C57. Dividiendo las células 3LL (PCNA-positivo, azul) se infiltraron y se rodearon con astrocitos activados (GFAP-positivo, café). Ambos experimentos se validaron por el modelo xenograft murine-humano el cual reprodujo el fenómeno observado en las muestras clínicas de humanos, y en el modelo de ratón singénico. Un aspecto de la presente invención es por lo tanto, un modelo *in vivo* de metástasis en células en cerebro de ratón-humano que es útil, por ejemplo, al estudiar los fenómenos de cáncer de cerebro metastásico humano.

Experimento 2 – Estudios por microscopía electrónica de barrido.

000032

Habiendo establecido la interacción de los astrocitos murine *in vivo* con células de tumores humanos en la formación de metástasis cerebral, de la misma manera como se ha visto en los especímenes clínicos primarios humanos, los inventores examinaron las interacciones de estos dos tipos de células, *in vitro*, en un sistema simplificado de co-cultivo. Hubo incertidumbre sobre si tal sistema debería producir cualquier interacción célula-a-célula, mucho menos teniendo relevancia fisiológica directa a la situación *in vivo*, descrita anteriormente. Fue por lo tanto, un descubrimiento sorprendente que las interacciones intercelulares entre líneas de células de metástasis de cáncer en humanos y astrocitos murine se lograran *in vitro*.

10

● Materiales y métodos

Líneas celulares y condiciones del cultivo. La línea celular de cáncer de seno humano, MDA-231 (S3), una variante metastásica de cerebro humano, la línea celular PC14Br4 (Si) de adenocarcinoma de pulmón humano y fibroblastos NIH 3T3 murine se mantuvieron como cultivos en monocapa en un medio mínimo esencial completo de Eagle (CMEM) suplementado con suero fetal de bovino (FBS; HyClone, Logan, UT), al 10%, piruvato de L-glutamina, aminoácidos no esenciales, el doble de solución de vitaminas, y penicilina estreptomycin (GIBCO/Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos los reactivos usados para el cultivo de tejidos estuvieron libres de endotoxinas como se determinó por el ensayo limulus amebocyte lysate (Associate of Cape Cod, Woodshole, MA), y las líneas celulares estuvieron libres de los siguientes patógenos murine: Mycoplasma spp, virus Hantan, virus de la hepatitis, virus minute, adenovirus (MAD1, MAD2), virus citomegalovirus, virus ectromelia, virus que eleva la lactato dehidrogenasa, virus polima, y virus Sendai (ensayados por Research Animal Diagnostic Laboratory, University of Missouri, Columbia, MO). Las células usadas en este estudio fueron del stock congelado y todos los experimentos se llevaron a cabo en 10 pasadas *in vitro* después de la descongelación.

15

20

25

. 000033

Aislamiento y mantenimiento de astrocitos murine. Ratones neonatos homocigóticos para el antígeno T grande SV 40 sensible a la temperatura (ratones-H-2Kb-tsA58; hibrid-CBA/ca x C57BL/10; Charles River Laboratories, Wilmington, MA) se sacrificaron en una cámara de dióxido de carbono, y se preparó la piel para cirugía de una manera estándar (S4). Se usaron unos micro fórceps estériles (Roboz Surgical Instrument Co., Gaithersburg, MD) para remover la piel del cráneo y se usaron unas microtijeras para hacer una incisión circular posterior desde la abertura de la oreja izquierda a la abertura de la oreja derecha. Se hizo otra incisión a lo largo de la línea media del cerebro, y el cráneo se dividió para tener acceso a la cavidad craneal. Se sujetaron los nervios ópticos y se removió el cerebro con unos fórceps romos y se colocó en 100-mm solución salina amortiguada de fosfato (PBS) enfriada con hielo. Se disecó toda la neurocorteza, y el hipocampo y se removieron las estructuras internas para dejar solamente las capas corticales. Se despojaron de las meninges, y las capas corticales se cortaron con un escalpelo y se sometió a digestión durante 30 minutos a 37°C en un medio Dulbecco modificado (DMEM) que contenía 0.1% de colagenasa (150 U/ml; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) y 40 pg/ml de deoxiribonucleasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El tejido se trituró en DMEM que contenía 10% de FBS y se filtró a través de malla 50-µm estéril. La suspensión de células únicas resultante se colocó en placas de 75-cm² en recipientes para tejido de cultivo que habían sido previamente recubiertos con laminina de ratón 5 µg/ml (Sigma). A las células se les permitió crecer durante 7 días en DMEM que contenía 10% de FBS y suplementos (ver anteriormente) en una atmósfera de dióxido de carbono de 8% (para alcanzar una amortiguación de pH adecuada a 33°C). Al mismo tiempo, se formaron células astrogliales una monocapa confluyente con neuronas, oligodendrocitos y fibroplastos aumentando cada vez más en la parte superior. Estas células contaminantes se retiraron por agitación rotatoria de los recipientes durante toda la noche a 250 revoluciones por minuto en un cuarto caliente. Los cultivos resultantes estaban compuestos de más de 95% de astrocitos como se determinó por inmunoreactividad

con anticuerpos directamente contra GFAP. Estos cultivos se aumentaron, se repitió el procedimiento y se determinó que el porcentaje de astrocitos en estos cultivos se excedía el 99%.

5 ***Imágenes por microscopía electrónica de barrido de células de tumor cultivadas y astrocitos.***

Las células de cáncer de seno humano MDA-MB-231 y los astrocitos murine se colocaron en placas en DMEM que contenía 5% de FBS en cubreobjetos de vidrio esterilizados en placas de 24 pozos con una densidad de 2.4×10^4 células. Después de
 10 48 horas, los cubreobjetos se removieron y se fijaron por 1 hora a temperatura ambiente en una solución que contenía 3% glutaraldehído /2% para formaldehído/7.5% sacarosa en un amortiguador 0.1 M de cacodilato (pH 7.3). Las muestras luego se lavaron con amortiguador de cacodilato 0.1 M y se post-fijaron durante 1 hora con solución de 1% de tetróxido de osmio amortiguada con cacodilato y que contenía 7.5%
 15 de sacarosa. Las muestras se lavaron con solución amortiguadora 0,1 M de cacodilato seguida por agua destilada y tratada secuencialmente por 30 minutos en la oscuridad con solución acuosa de ácido tánico 1% filtrada en Millipor, lavada con agua destilada y con solución acuosa de acetato de uranilo al 1% filtrada a través de Millipor, durante 1
 hora en la oscuridad. Las muestras se lavaron vigorosamente con agua destilada, se
 20 deshidrataron por una serie ascendente de etanoles, y luego se transfirieron por 5 minutos cada una a una serie graduada con aumento de las concentraciones de hexametildisilazano y se les permitió secarse al aire durante toda la noche. Las muestras se montaron sobre tabs de carbono de doble espesor (Ted Pella, Inc., Redding, CA) que habían sido montadas previamente sobre montajes de especímenes
 25 de aluminio (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA). Las muestras luego se recubrieron al vacío usando un evaporador Balzer MED 010 (Technotrade International, Manchester, NH) con aleación de platino para un espesor de 25 nm y luego inmediatamente se recubrieron al vacío con carbono en flash. Las muestras se

pasaron a un desecador para examinarlas en una fecha posterior. Las muestras se examinaron usando un microscopio electrónico de barrido JSM-5910 (JEOL, Inc., Peabody, MA) con un voltaje de aceleración de 5 kV.

5 Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 1- . El cultivo *in vitro* de MDA-MB-231 de células (T) de cáncer de seno y astrocitos murine (A) se evaluaron por microscopía electrónica de barrido. El contacto directo, es evidente, entre los astrocitos (que se extienden pods-feet) y células de tumor. Un astrocito único puede estar en contacto con múltiples células del tumor. Estos parecen estar formando completamente uniones en hendidura de la calidad vista entre los astrocitos y las neuronas del sistema nervioso central. Se ven resultados similares con líneas celulares de melanoma, cáncer de seno, y cáncer de pulmón (no se muestran).

15 **Experimento 3 – Ensayos de uniones en hendidura**

Para además validar la naturaleza funcional de las uniones en hendidura que se muestran en la Figura 1, Los inventores realizaron experimentos de transferencia de colorante, para establecer si las uniones en hendidura eran funcionales como las estructuras vistas en el experimento 2.

20

Materiales and Métodos

Comunicación por las uniones de hendidura

25 La comunicación por las uniones de hendidura entre las células de tumor receptor (MDA-MB-231) y las células donoras (astrocitos, células 3T3, MDA-MB-231) se analizaron por citometría de flujo midiendo la transferencia del colorante, Brevemente, las células receptoras (300,000 células/pozo) se pusieron en una placa de seis pozos y

. 000036

se cultivaron toda la noche. Al mismo tiempo, las células donoras se marcaron durante 45 minutos con 1 µg/ml de calceína-AM verde (Molecular Probes) seguidamente se lavaron extensivamente. Las células donoras (60,000 células/pozo) se co-cultivaron durante 5 horas con las células receptoras ya sea directamente o a través de la cámara del trans-pozo (Transwell-Boyden Chamber, 0.4 µm Tamaño de poro; Costar, Corning, NY). Las células se cosecharon, se lavaron, se fijaron en etanol, y se analizaron por citometría de flujo. La formación de uniones en hendidura se calculó como el porcentaje de desplazamiento del pico FITC (S9- SI I).

10 Resultados

Como se mostró en la Figura 2, los astrocitos de células de cáncer metastásico co-cultivados mostraron transferencia del colorante entre las células co-cultivadas. El sistema de co-cultivo de los inventores por lo tanto produce uniones de hendidura activas formadas entre los astrocitos murine y las líneas celulares de cáncer metastásico humano. El control de los experimentos trans-pozo demuestra esto, que es una genuina interacción célula-célula. Un segundo aspecto de la presente invención es por lo tanto un sistema de co-cultivo de células humanas metastásicas-astrocito *in vitro*, de ratón, útil por ejemplo en el estudio de los fenómenos de la interacción de cáncer de cerebro metastásico con astrocitos en un marco *ex vivo* manipulable.

Experimento 4 –Ensayos de quimioprotección.

La modelación de la quimiorresistencia de la metástasis cerebral es y será mayor con el uso tanto del sistema del modelo *in vivo* con el sistema de modelo de co-cultivo de células *in vitro*. Porque el sistema basado en el co-cultivo es más dócil a la manipulación experimental, fue además, evaluado para determinar si la

. 000037

quimiorresistencia de la metástasis cerebral vista *in vivo* se replica por el sistema de cultivo basado en las células.

Materiales y métodos.

5

Ensayo de quimioprotección en co-cultivo *in vitro*. Los astrocitos y los fibroblastos NIH 3T3 se transfectaron con genes GFP como se describió previamente (S5, S6). Las células de tumor blanco u objetivo, astrocitos, o fibroblastos 3T3 se cosecharon en 60-70% de un cultivo confluyente brevemente (2 -minutos) se expusieron a tripsina 0.25%

10 en una solución al 0.1% de EDTA/PBS. Las células se desprendieron tocando los frascos de cultivo rápidamente y se resuspendieron en CMEM. Los astrocitos murine, los fibroblastos 3T3, y las células de tumor se colocaron en una placa solas o como co-cultivo en una razón de células de tumor /astrocito/células 3T3 de 1:2 sobre cada pozo de diámetro de 35-mm de una placa estéril multipozos de cultivo de tejidos de 6 pozos.

15 A las células se les permitió adherirse toda la noche en una incubadora humidificada a 37°C en una atmósfera de 6.4% de dióxido de carbono mas aire. Los cultivos luego se lavaron y se incubaron con CMEM fresco (control negativo) o un medio que contenia varias concentraciones de TAXOL® (Paclitaxel; NDC 0015-3476-30, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) y otros medicamentos quimioterapéuticos (ver más adelante).

20 Después de 72 horas, los astrocitos etiquetados con GFP o las células NIH 3T3 se clasifican y la fracción apoptótica de las células de tumor se determinaron por tinción con ioduro de propidio y los análisis FACS (ver adelante) Para determinar si el contacto directo de las células de tumor y los astrocitos (o fibroblastos sirven como control) fue pre-requisito producir inducción a la resistencia por quimioterapia. Nosotros hicimos un

25 ensayo de co-cultivo usando una cámara Transwell-Boyden i.e., colocando las células de tumor en la cámara y los astrocitos Immorto (o los fibroblastos) en el pozo. Después de 72 horas de incubación el índice apoptótico relativo de las células de tumor se determinó como se describe más adelante.

000038

En el segundo conjunto de estudios *in vitro*, se determinó si la inducción mediada por los astrocitos, de la resistencia de las células a los medicamentos quimioterapéuticos es transiente o permanente. Las células PC14Br4 de de cáncer de pulmón humano se co-
 5 cultivaron con ya sea astrocitos o fibroblastos 3T3 en un medio solo o en medio que contenía 5 ng/ml de paclitaxel. Después de 72 horas, los astrocitos o las células 3T3 células se separaron de las células de tumor por FACS, y se determinó el índice apoptótico relativo de las células de tumor en pozos múltiples con tinción de ioduro de propidio como se describe adelante. De los pozos paralelos se cosecharon las células
 10 sobrevivientes de tumor y se volvieron a colocar en una placa sobre diferentes monocapas de astrocitos o células 3T3. Estos co-cultivos de células de tumor primero se co-cultivaron con astrocitos y luego con ya sea astrocitos o células 3T3, o de células de tumor primero cultivadas con células 3T3 y luego ya sea con células 3T3 o astrocitos. Luego en la segunda vuelta los co-cultivos luego recibieron medios que
 15 contenía 5 ng/ml de paclitaxel. Después de 72 horas, el índice apoptótico relativo de células de tumor se determinó por tinción con ioduro de propidio y análisis FACS.

Preparación de la tinción de ioduro de propidio y los análisis FACS. El medio sobrenadante que contiene células flotantes se colectó de cada caja en un tubo de
 20 centrífuga cónico de 15-ml. Las células unidas se cosecharon por breve exposición a tripsina al 0.25% en una solución que contenía 0.1% de EDTA/PBS. Las células se combinaron con el correspondiente medio sobrenadante. Las muestras se peletizaron por centrifugación a 100 g durante 5 minutos. Los pellets se resuspendieron en 10 ml de HBSS y además se peletizaron a 100 g durante 5 minutos. Las muestras se
 25 resuspendieron en un vórtex y las células se fijaron en 1 ml de paraformaldehído 1% durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Las muestras se transfirieron a tubos de polipropileno de microcentrifuga y las células fijadas se lavaron con 1 ml de PBS y

000039

luego se peletizaron a 10,000 g durante 1 minuto. Los pellets se resuspendieron en un vórtex y las células se fijaron durante toda la noche en 1 ml de etanol a -20°C .

Las células subsiguientemente se pusieron en un vórtex y se peletizaron en una microcentrífuga a 10,000 g durante 1 minuto. Las muestras entonces se colocaron en un vórtex y los pellets resuspendidos y teñidos en 300 de ioduro de propidio (50 $\mu\text{g/ml}$; Cat. P4864, Sigma) que contenía RNasa (15 $\mu\text{g/ml}$; Cat. A7973, Promega, Madison, WI) durante 20-30 minutos a 37°C . Las muestras se transfirieron finalmente a tubos plásticos de cultivo de 5-ml para el análisis FACS usando un citómetro Coulter EPICS Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). Se determinó el índice apoptótico relativo por comparación del índice apoptótico de las células de tumor/índice apoptótico de células de tumor y astrocitos inmortal o células de tumor y fibroblastos NIH 3T3 x 100 (%) (S7).

Resultados

Cultivando las células de cáncer de seno humano MDA-MB-231 o las células de cáncer pulmonar PC14Br4 de humanos con astrocitos (pero no con fibroblastos 3T3) se reduce el índice apoptótico relativo (i.e. aumentando la quimiorresistencia) de células de tumor incubadas durante 72 horas con paclitaxel (5 ng/ml) con $58.3 \pm 8.9\%$ (media $\pm$ S.D., $P < 0.01$) y $61.8 \pm 6.7\%$ (media $\pm$ S.D., $P < 0.05$), respectivamente (el índice apoptótico se comparó por el ensayo de la t de Student (FIG. 3). Esta reducción fue dependiente del contacto directo entre las células de tumor y los astrocitos. Los inventores basaron esta conclusión en los datos mostrados cuando las células de tumor y los astrocitos se separaron por medio de una membrana semi-permeable (Transwell-Boyden Chamber, membrana de 0.4 μm de tamaño de poro; Costar, Corning, NY), no se observó el efecto quimio protector de los astrocitos. El co-cultivo de células de tumor con fibroblastos 3T3 no protegió las células de tumor de la quimioterapia (FIG. 3). El co-cultivo de células de tumor de humanos con un control alterno usando fibroblastos aislados de ratón H-2k^b-tsA58 tampoco protegió a las células de tumor de los agentes quimioterapéuticos (datos

: 000040

que no se muestran). Resultados análogos se pueden ver usando ensayos estándar MTT para determinar el grado de citotoxicidad (datos que no se muestran). [Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (July, 1991) "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in cultivo." Cancer Communications 3 (7): 207-212.].

Estos datos validan que el sistema de co-cultivo basado en la célula divulgado aquí reproduce el fenómeno de la quimiorresistencia de la metástasis cerebral. La habilidad no esperada del sistema de co-cultivo para replicar la quimiorresistencia por lo tanto lo hace adecuado para uso en el estudio del mecanismo de la quimiorresistencia y las potenciales intervenciones terapéuticas para anular la quimiorresistencia en la metástasis existente *in vivo*

Para ampliar sobre estos experimentos iniciales, los inventores ensayaron diferentes agentes quimioterapéuticos adicionales, representativos de las clases mayores de medicamentos que se usan hoy en día. Se cultivaron células PC14Br4 de cáncer de pulmón humano solas o con astrocitos (contacto directo célula a célula) en un medio que contenía P-glicoproteína-asociada a Adriamicina (200 ng/ml), paclitaxel (5 ng/ml), vinblastina (3 ng/ml), vincristina (8 ng/ml), y P-glicoproteína-disociada 5-FU (500 ng/ml) o cisplatino (2.4 µg/ml). El co-cultivo con astrocitos indujo protección significativa ($P < 0.01$) contra todos los medicamentos (FIG. 4). Este hallazgo inesperado valida además el sistema de co-cultivo basado en la célula. El sistema de cultivo de células demuestra la robustez de la quimiorresistencia inducida por los astrocitos de una manera que es directamente comparable a la quimiorresistencia de la metástasis cerebral que se ve *in vivo* en los conjuntos clínicos. Un tercer aspecto de la presente invención es por lo tanto el de los ensayos de quimiorresistencia basados en la célula *in vitro*, útiles por ejemplo, en el estudio de los fenómenos de la protección mediada por astrocitos de células de metástasis cerebral a partir de la muerte celular inducida por

quimioterapia citotóxica. En particular, las implementaciones *in vitro* de las células basadas en los ensayos de quimiorresistencia se pueden usar para sondear uno o más candidatos de los agentes quimioterapéuticos para evaluar el grado de la protección mediada por los astrocitos contra los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos.

Se resumen en la Figura 5 los experimentos adicionales que demuestran que la protección de las células de metástasis cerebral mediada por astrocitos a partir de la muerte celular inducida por quimioterapia citotóxica no es mayor de 72 horas después de que se pierde el contacto entre los astrocitos y las células de metástasis cerebral. Además, las células que presentan pérdida del efecto protector dado por el contacto anterior de los astrocitos, se pueden volver a proteger por un segundo co-cultivo con astrocitos para volver a adquirir la protección mediada por los astrocitos contra los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos completamente. Estos refleja las observaciones clínicas de los tumores primarios y en aún otras metástasis no cerebrales dando respuesta química mientras que sus derivados de la metástasis cerebral son quimiorresistentes.

Experimento 5 – Mecanismo de quimiorresistencia mediada por astrocitos.

Los inventores aplicaron el ensayo de quimiorresistencia, anterior, basado en las células para investigar los mecanismos potenciales subrayados en este fenómeno. El perfil de la expresión de los genes mas el ensayo Western blot y la confirmación de la producción de proteínas se usó para investigar la protección mediada por astrocitos de células de metástasis cerebral a partir de la muerte celular inducida por quimioterapia citotóxica.

000042

Materiales y Métodos

Perfiles de expresión de genes por análisis de microarreglo de RNA. En el primer conjunto de experimentos, células MDA- MB-231 o PC14Br4 se incubaron solas, con astrocitos murine, o con fibroblastos NIH 3T3 en una placa de 6 pozos con un diámetro de 35-mm (Cat. 353046, BD Falcon TM, San Jose, CA). Para comprobar el contacto célula a célula, la relación de células de tumor a astrocitos murine o células NIH 3T3 fue 1:2. Después de 72 horas, los astrocitos murine etiquetados con GFP o fibroblastos se resolvieron por FACS, y las células de tumor se procesaron por análisis de microarreglos. En el segundo conjunto de experimentos, se determinó si la expresión de los genes asociada con la resistencia de las células tumorales a los medicamentos quimioterapéuticos era dependiente de un contacto continuo con los astrocitos. Las células MDA-231 o las células PC14Br4 se co-cultivaron con ya sea astrocitos murine o con células NIH 3T3 durante 72 horas. Los astrocitos murine o las células NIH3T3 se clasificaron y las células tumorales se procesaron ya sea para determinar los perfiles de expresión de los genes por análisis de microarreglos o se pusieron en una placa para una segunda ronda de co-cultivos con astrocitos murine o con fibroblastos, las células tumorales inicialmente cultivadas con fibroblastos se co-cultivaron otra vez, con fibroblastos o con astrocitos. Por lo tanto las células tumorales se cultivaron con astrocitos murine, se co-cultivaron otra vez con astrocitos murine o con fibroblastos y, a la inversa las células tumorales cultivadas inicialmente con fibroblastos se co-cultivaron nuevamente con fibroblastos o astrocitos. Después de 72 horas de incubación, los astrocitos murine o los fibroblastos se clasificaron y las células tumorales se procesaron para análisis de microarreglos.

Análisis de microarreglos. Se usó en total RNAs (500 ng) para etiquetar e hibridizar de acuerdo con los protocolos del fabricante (Illumina, Inc., San Diego, CA). Brevemente, se generó cDNA a partir del RNA total usando el kit IlluminaR de amplificación de RNA

000043

prep Total (Applied Biosystem, Austin, TX). Luego, se llevó a cabo la transcripción *in vitro para incorporar* nucleótidos marcados con biotina al cRNA durante 4 horas a 37°C. Se hibridizó un total de 1500 ng de CnRNA marcado con biotina para chip de perlas de expresión 6-v2 en humanos de SentrixR Illumina a 58°C durante toda la noche (16 horas) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cRNA hibridizado biotinilado se detectó con 1 µg/ml de cianina 3-estreptavidina (GE Healthcare, Piscataway, NJ), y las chips de perlas se escanearon con el lector Illumina en arreglo en lecho (Illumina, Inc.). Los resultados de los datos de los microarreglos se extrajeron con Bead Studio 3.7 (Illumina, Inc.) sin ninguna normalización o sustracción del fondo. Los datos de la expresión de los genes se normalizaron usando el método de normalización por cuantiles en un paquete LIMMA en R (www.r-project.org) (S12). El nivel de expresión de cada gen se transformó a log2 antes de otro análisis. Para seleccionar los genes que se expresan diferencialmente en dos grupos de tejidos, se usó una herramienta de comparación de clases en BRB Arreglo de herramientas (v 3.6; Biometrics Research Branch, National Cancer Institute, Bethesda, MD) como un método para pruebas t para dos muestras con la estimación de FDR.

Análisis Western blot. El Western blot se usó para confirmar los resultados del microarreglo. Brevemente, los lisatos de todas las células se clasificaron por FACS, se prepararon usando 1 ml de lisis con amortiguador (10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% deoxicolato, 1% NP40, 0.14 M NaCl, 1 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml aprotinina, y 1 µg/ml de pepstatina) que contenía una mezcla de inhibidor de proteasa (Roche, Indianapolis, IN). Las muestras que contenían cantidades iguales de proteína (30 µg) se separaron por electroforesis sobre geles de 4-12% de Nu-PAGE (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear con TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) que contenía 5% de una leche sin grasa, se incubaron las membranas a 4°C durante toda la noche con anticuerpo monoclonal de ratón contra

000044

BCL2 (1 :1,000, BD PharMingen, San Diego, CA), anticuerpos policlonales de conejo contra BCL2L1 (1 :1,000, Cell Signaling, Beverly, MA), anticuerpos policlonales de conejo contra TWIST (1 :1000, señalización de las células), anticuerpos monoclonales de ratón contra glutathion S-transferasa (1 :1,000, BD PharMingen), y anticuerpos monoclonales de ratón contra 13-actina (Sigma). Las manchas luego se expusieron a anticuerpos secundarios de peroxidasa conjugada de rábano (1 :3000) y se visualizaron con la mejora en el sistema de la quimioluminiscencia de Amersham (Piscataway, NJ). Una carga igual de proteína se confirmó por pelado de las manchas y se volvieron a probar con anticuerpos de antiactina-13.

10

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico del perfil de expresión de los genes, El nivel de expresión de cada gen se transformó a log2 antes de otro análisis. Una herramienta de comparación de clase en BRB Arreglo de herramientas (v 3.6; Biometrics Research Branch, National Cancer Institute, Baltimore, MD) para pruebas t para dos muestras con la estimación de FDR que fue el método usado para determinar la significancia estadística de los genes expresados diferencialmente entre células de tumor co-cultivadas con diferentes células hospederas. El diagrama de genes de Venn se seleccionó por un ensayo univariado (un test de t para dos muestras) con el test de permutación multivariada (10,000 permutaciones al azar). Se aplicó un valor de corte P de menos de 0.001 para retener los genes cuya expresión es significativamente diferente entre los dos grupos de tejidos examinados.

Resultados

Los inventores identificaron genes de células tumorales cuya expresión comúnmente se altera enseguida al co-cultivo con astrocitos por aplicación de pruebas t para dos muestras ($P < 0.001$). Usando este procedimiento, los inventores identificaron en las células MDA-MB-231, 1069 genes, y en las células PC14Br4, 594 genes que se expresaron de manera diferencial (FIG. 7). Una comparación de una lista de genes

000045

dobles reveló el aumento en la expresión de algunos genes bien conocidos a ser asociados con la anti-apoptosis y la supervivencia: glutatión S transferasa 5 (GSTA5), BCL2L1, TWIST (Fig. 7). La expresión de estos genes se confirmó a nivel de proteínas por el análisis Western blot .(FIG. 8).los inventores luego determinaron si el patrón de expresión alterada de los genes en las células de tumor co-cultivadas con astrocitos (pero no para fibroblastos) era permanente o transiente. Los inventores co-cultivaron células de tumor por un ciclo con astrocitos o fibroblastos, y luego se cosecharon las células de tumor y se colocaron en una placa en una segunda pasada sobre astrocitos o fibroblastos. Cuando los datos de la expresión de los genes se colectaron de los dos ciclos de los experimentos de co-cultivo, la influencia del segundo co-cultivo fue dominante en los patrones de expresión genética de las células de cáncer. A pesar de la primera condición del co-cultivo, las células de cáncer co-cultivadas con astrocitos en el segundo ciclo presentaron una firma de expresión de los genes distintiva que se detectó en los experimentos del primer ciclo de cultivo (alta expresión de GSTA5, BCL2L1, y TWIST), en donde las células de cáncer co-cultivadas con astrocitos en la primera pasada perdieron las firmas de la expresión de los genes específicas cuando se co-cultivaron con fibroblastos en la segunda pasada (FIG. 9). Este resultado es paralelo al de los ensayos de quimioprotección *in vitro* resumidos en la Figura 5 y prueban que el patrón de expresión de los genes en las células de tumor depende del contacto constante con los astrocitos. Las células de tumor co-cultivadas en la segunda pasada con astrocitos también expresaron un alto nivel de los genes TCF 4, CD24, CARD14, y EFNB2 (datos que no se muestran). Los estudios clínicos muestran que la expresión de las células tumorales de estos genes está correlacionada con un pobre pronostico. Un cuarto aspecto de la presente invención es, por lo tanto, un ensayo de quimiorresistencia basado en células *in vitro* que tenga un componente de diagnóstico molecular el cual es útil, por ejemplo, al estudiar el fenómeno de la protección mediada por astrocitos de la metástasis de células cerebrales a partir de la muerte celular

000046

inducida por citotoxicidad quimioterapéutica en un conjunto *ex vivo*. En ciertas implementaciones, el componente de diagnóstico molecular es una o más de la etapa del perfil de expresión de los genes y un análisis de las concentraciones celulares de proteínas. En unas implementaciones, una firma determinada de la expresión de los genes se utiliza para evaluar los efectos de las intervenciones experimentales en, e.g., eliminar la protección mediada por astrocitos. Un quinto aspecto de la invención es una firma de la expresión de los genes o una combinación de los perfiles de nivel de proteínas indicativos de la protección mediada por los astrocitos de las células en metástasis cerebral de muerte celular inducida por quimioterapia citotóxica. Un sexto aspecto es el proceso de producir dicha firma de los genes o los perfiles de los niveles de las proteínas como se describió y se ejemplificó anteriormente.

Experimento 6 – Expresión de los receptores de endotelina por células tumorales y astrocitos.

300,000 células MDA-MB-231 de cáncer de seno humano se cultivaron por 24 horas con 600,000 astrocitos etiquetados con GFP o con fibroblastos 3T3 etiquetados con GFP. Las células luego se colectaron y se clasificaron para aislar las células MDA-MB-231. Se extrajeron las proteínas, y se analizaron por Western blots, y se hibridizaron con anticuerpos anti-ETAR. Los datos se muestran en la Figura 10, claramente demuestran que las células de tumor co-cultivadas con astrocitos expresan un alto nivel de ETAR.

En el siguiente conjunto de estudios, 10,000 células MDA-MB-231 etiquetadas con GFP se co-cultivaron con 20,000 astrocitos en una cámara de láminas. Veinte y cuatro horas más tarde, los cultivos se trataron durante 24 horas con Taxol (15 ng/ml) y luego se tiñeron para pAKT fosforilado (fijación con 4% de PFA).

Como se muestra en la Figura 11, las células de tumor se co-cultivaron con astrocitos (y Taxol) expresadas por altos niveles de pAKT. Entonces, el co-cultivo con astrocitos

000047

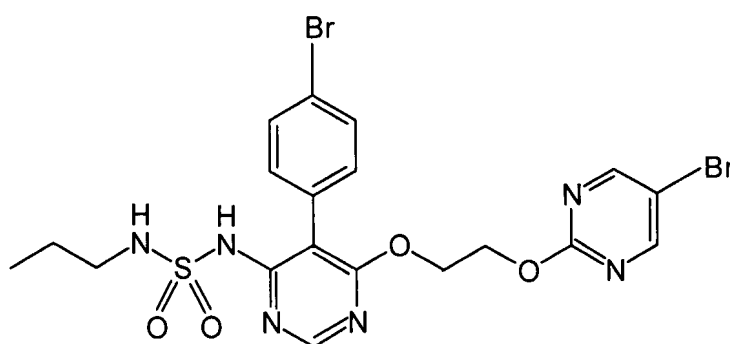
produce aumento en la expresión de ETR y factores de sobrevivencia para células de tumor lo cual está correlacionado que las células tumorales aumentan la resistencia a los medicamentos quimioterapéuticos. Estudios similares con anticuerpos anti-ETBR revelaron la expresión ETBR

5

Experimento 7 – Antagonistas del receptor de endotelina no producen efectos citotóxicos contra las células tumorales.

Usando el esquema de ensayo de quimiorresistencia basado en células in vitro descrito anteriormente, los inventores ensayaron dos antagonistas de los receptores de endotelinas teniendo afinidad dual para ETAR y ETBR para evaluar el grado de la protección mediada por los astrocitos contra los efectos citotóxicos del agente quimioterapéutico. Un antagonista ETR ensayado fue Bosentan que está aprobado por EMEA para uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar arterial (PAH). El segundo medicamento ensayado se designó como ACT-064992 y es un derivado de Bosentan también tiene afinidad dual para ETAR/ETBR,. ACT-064992 se designa formalmente como Macitentan, y tiene la estructura [7V-[5-(4- bromofenil)-6-(2-(5-bromopirimidin-2-iloxi)etoxi)-pirimidin-4-il]-N'- propilaminosulfonamida] :

20



Macitentan

000048

Iglarz M, et al., Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist, J Pharmacol Exp Ther. 2008 Dec; 327(3):736-45. Epub 2008 Sep 9. La divulgación original de la molécula ACT-064992, su síntesis y su actividad farmacológica se pueden encontrar en WO02/053557. La ACT-064992 es aproximadamente tres veces más activa que el Bosentan (i.e. se requiere 1/3 de la dosis). En este documento, los datos detallados se refieren a los experimentos con ACT-064992; sin embargo, se consiguen resultados análogos mediante experimentos con dosis más altas del Bosentan.

Se adicionó la ACT-064992 (100 nM) al ensayo de co-cultivo a base de células, descrito antes, con una relación de 1:2, célula tumoral: célula de astrocito o célula tumoral: fibroblastos 3T3 durante 48 horas, y se midió el grado de apoptosis como se describió antes. Como se muestra en la Figura 12 (cáncer de seno MDA-231) y en la Figura 13 (cáncer de pulmón PC14), la ACT-064992 adicionada sola o con astrocitos o con fibroblastos 3T3 no produjo efectos citotóxicos medibles.

Experimento 8 – Antagonistas del Receptor de la Endotelina en Combinación con Agentes Quimioterapéuticos.

Como se muestra antes los antagonistas ETR no fueron efectivos en la forma de un agente quimioterapéutico único. Este resultado negativo causó el efecto sorprendente visto con los antagonistas ETR como un componente de terapias de combinación altamente inesperado. En experimentos de co-cultivo, las relaciones del cultivo celular fueron 1:2, célula tumoral: célula astrocito (50.000: 100.000), y los tratamientos se

000049

hicieron utilizando paclitaxel (TAXOL®) (6 ng/ml) y/o ACT-064992 (100 nM) durante 48 horas (FIG. 15; $*p<0,01$). Para los experimentos de control que utilizan células MDA-MB-231 tuvo lugar la misma protección mediada por el astrocito a partir del paclitaxel, como en experimentos previos. Se presentaron dos resultados sorprendentes a partir de estos experimentos de combinación. Primero, la combinación de paclitaxel y ACT-064992 en los controles sin astrocitos no produjeron un incremento significativo en la muerte celular por encima del presentado por el paclitaxel solo. Esto se observó en por lo menos tres experimentos independientes (FIG. 15). Estos resultados se reprodujeron utilizando células humanas de cáncer de pulmón PC14Br4 (FIG. 16). De este modo, bajo las condiciones ensayadas, los antagonistas ETR tampoco fueron efectivos en combinación, de la misma forma como se observó en el Experimento 6 como un agente único. En los co-cultivos con células tumorales de astrocitos, la ACT-064992 mostró la habilidad inesperada de anular la protección mediada por el astrocito del paclitaxel. Aún más sorprendente, la ACT-064992 realmente incrementó la eficacia del paclitaxel, comparada con los experimentos de control sin astrocitos, para supersensibilizar las células tumorales metastásicas al paclitaxel. La adición de ACT-064992 a los co-cultivos de astrocitos y células tumorales inhibió la expresión de los factores de supervivencia pAKT y pMAPK (FIG. 17). Esta inhibición estuvo directamente correlacionada con el incremento en la muerte de células tumorales mediada por el medicamento quimioterapéutico. Este sinergismo se hace aún más sorprendente porque los experimentos sin astrocitos no demostraron ni siquiera efectos aditivos. Estos resultados impresionantes demuestran la importancia de los métodos nuevos de tamizado de co-cultivos, divulgados en este documento, porque los efectos de los antagonistas ETR en la terapia de combinación no se habrían observado en un esquema estándar de ensayo de líneas celulares tumorales sin astrocitos co-cultivados. De esta manera, un séptimo aspecto de esta investigación es el uso de antagonistas del receptor de la endotelina en combinación con uno o más agentes citotóxicos quimioterapéuticos y/o terapia con radiación, para tratar un tumor existente en un

000050

individuo con metástasis cerebral. En implementaciones particulares, esta terapia de combinación supersensibiliza la metástasis cerebral existente a los agentes citotóxicos quimioterapéuticos y/o terapia con radiación, co-administrada con el antagonista ETR.

5 **Terapia *In vivo* del Antagonista del Receptor de la Endotelina para Metástasis Cerebral Existente**

La entrega *in vivo* del antagonista(s) del receptor de la endotelina y agentes quimioterapéuticos co-administrados se puede conseguir mediante la misma entrega oral y o sistémica ya desarrollada y utilizada en pruebas clínicas previas, para varios miembros de esta clase de compuestos. El desarrollo y la optimización de tales regímenes terapéuticos es rutina en el estado del arte. [Clinical trials: a practical guide to design, analysis and reporting Edited by Ameet Bakhai and Duolao Wang. Remedica, London 2005.] Un tema específico en relación con los cánceres cerebrales es el impacto de la barrera sanguínea cerebral. Aunque esto se ha citado, durante mucho tiempo, como un problema técnico que impide los tratamientos sistémicos para metástasis cerebral, el estado del arte ahora ha reconocido que incluso en micrometástasis la barrera sanguínea cerebral se interrumpe parcialmente. [Cavaliere R. and Schiff D., Chemotherapy and cerebral metastases: misperception or reality? *Neurosurg Focus*. 2007 Mar 15; 22(3):E6.] Por esto, es razonable esperar que la aplicación sistémica del antagonista(s) del receptor de la endotelina vaya a penetrar y tenga efecto terapéutico en tumores cerebrales metastásicos. Adicionalmente, ciertos miembros de la familia del antagonista(s) del receptor de la endotelina tienen la habilidad de cruzar incluso intacta la barrera sanguínea cerebral, haciéndolos de esta manera particularmente adecuados para uso en terapia *in vivo* de tumores cerebrales metastásicos. [Vatter H, et al., Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin (B) receptor- mediated

000051

relaxation. *J Neurosurg.* 2005 Jun; 102(6): 1108-14.] Finalmente, la infusión o la inyección directa en el tumor del antagonista(s) del receptor de la endotelina pueden ser apropiadas cuando el tamaño de los tumores metastásicos lo convierte en un método practicable.

5

Terapia *in vivo* para metástasis cerebral en ratones

Con el fin de validar posteriormente la eficacia de la terapia con el antagonista del receptor de la endotelina, para metástasis cerebral existente, los inventores llevaron a
 10 cabo experimentos ejemplificantes *in vivo* utilizando ratones. Ratones desnudos se inyectaron con 10.000 células viables MDA231 a través de la arteria carótida interna. El trabajo preliminar en patología reveló que metástasis visible establecida se formó dos semanas después de la inyección (los datos no se muestran). Así que, en este momento, los inventores comenzaron los tratamientos.

15

Experimento 9 – Efectos de la ACT-064992 y la temozolomida en el crecimiento *in vivo* de tumores

Se inyectaron ratones desnudos en la arteria carótida interna, con 10.000 células
 20 viables MDA231. Dos semanas después de la inyección, los grupos de tratamiento fueron: Control (vehículo) (FIG. 18A); temozolomida ("TMZ") 10mg/kg p.o., diariamente (FIG. 18B); ACT-064992 50 mg/kg, p.o. diariamente (FIG. 18C); o combinación de TMZ + ACT-064992 (FIG. 18D).

25 Se dio muerte a todos los ratones en el día 28 del tratamiento. Las secciones cerebrales se fijaron y tiñeron. Las metástasis cerebrales se evaluaron visualmente. Especímenes ejemplificantes se muestran en la FIG. 18A-D en los mismos aumentos. Como se puede ver en mayor detalle en la FIG 18E, la combinación de TMZ y ACT-064992 redujo

000052

enormemente el tamaño y la densidad de los tumores metastásicos, comparada con la TMZ sola. Esto demuestra que los resultados de los sistemas de cultivo celular, descritos arriba, correlacionan directamente con los efectos observados *in vivo*.

5 Experimento 10 - Efectos de la ACT-064992 y el Paclitaxel en el crecimiento *in vivo* de tumores

Se inyectaron ratones hembra desnudos (con edad de 10-12 semanas) en la arteria carótida interna, con 10.000 células viables MDA231. Dos semanas después de la inyección, cuando las metástasis cerebrales se establecieron, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de tratamiento (n=10): 1) Control (inyectado con solución del vehículo); 2) Paclitaxel (8 mg/kg administrados intraperitonealmente, una vez por semana); 3) ACT-064992 (50 mg/kg administrados oralmente, una vez al día); y 4) Combinación de ACT-064992 y Paclitaxel. Se aplicó la eutanasia a todos los ratones después de los 28 días de tratamiento y se les realizó la autopsia. Los cerebros se recolectaron para estudio histológico y la inmunohistoquímica. Se muestran resultados ejemplificantes en la

FIG 19. A. Control (19A), ACT-064992 (19B) y Paclitaxel (19C) tienen todos tumores metastásicos bien definidos. El grupo de ACT-064992 + Paclitaxel (19D) tenía colonias mucho más pequeñas de células tumorales.

Los resultados con temozolomida y paclitaxel demuestran que la terapia con el antagonista del receptor de la endotelina generalmente sensibiliza la metástasis cerebral hacia los agentes quimioterapéuticos.

25

Experimento 11 - Efectos de la ACT-064992 y el Paclitaxel en la proliferación *in vivo* de células tumorales

000053

Cortes representativos del cerebro provenientes de los cuatro grupos de tratamiento se tiñeron para CD31 (marcador endotelial celular) y Ki67 (marcador celular de la proliferación). Los cerebros de los ratones de control, de los ratones tratados únicamente con paclitaxel, o únicamente con ACT-064992 contenían un número grande de células en proliferación. En contraste marcado, los cerebros de los ratones tratados tanto con paclitaxel como con ACT-064992 contenían únicamente unas pocas células en división. FIG. 20A, B, C and D, respectivamente.

10 Experimento 12 - Efectos de la ACT-064992 y el Paclitaxel en la apoptosis *in vivo* de células tumorales

Los cortes del cerebro de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento se analizaron *in situ* mediante Marcación del extremo mellado mediada por la dUTP deoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL). Negoescu A, et al., J Histochem Cytochem. 1996 Sep; 44(9):959-68. Los cerebros de control, los tratados con Taxol y de los ratones tratados con ACT-064992 tenían pocas o no presencia de células apoptóticas. FIG. 21 A-C. En contraste marcado, los cerebros de los ratones tratados con la combinación de ACT-064992 más Taxol tenían un número grande de células apoptóticas tumorales (verdes) y células endoteliales (amarillas) (FIG. 21 D).

Experimento 13

Los cortes de cerebro de los ratones provenientes de los cuatro grupos de tratamiento se inmunotiñeron para ET_AR (rojo) y fosfoserina (verde), la colocalización produjo color naranja-amarillo. Los cerebros de control expresaron ET_AR fosforilado tal como lo hicieron los cerebros de los ratones tratados con paclitaxel (FIG. 22A- B). El tratamiento con la ACT-064992 sola y con ACT-064992 + paclitaxel evitaron la fosforilación del

. 000054

ET_AR (FIG. 22C-D). Este resultado confirma la correlación de la actividad del antagonista del receptor de la endotelina y la sensibilización de tumores metastásicos hacia agentes quimioterapéuticos.

5 Experimento 14

Estudio de Supervivencia para el Tratamiento de la Metástasis Experimental Cerebral de Cáncer de Seno MDA231 Humanas con ACT064992 y Taxol

10 Detalles Experimentales

5 x 10³ células MDA231 se inyectaron de acuerdo con el protocolo del Experimento 10. El tratamiento comenzó el día 14 después de la inyección de acuerdo con el protocolo del Experimento 10. Se dibujó una curva de supervivencia y se obtuvo el p-valor para
15 comparar la significancia estadística entre los grupos del tratamiento.

Grupos del Tratamiento

Control (vehículo): administraciones diarias orales y una vez a la semana i.p.
20 inyecciones.

Paclitaxel (5 mg/kg): administraciones diarias orales del vehículo y una vez a la semana i.p. inyección de Paclitaxel.

ACT064992 (10 mg/kg): administraciones diarias orales de ACT064992 y una vez a la
25 semana i.p. inyecciones de Paclitaxel.

Resultados

000055

Día de la muerte (después del tratamiento)

Control: 42, 43, 53, 60, 64, 68, 68, 69, 69

5 Paclitaxel: 49, 53, 60, 63, 74, 74, 78

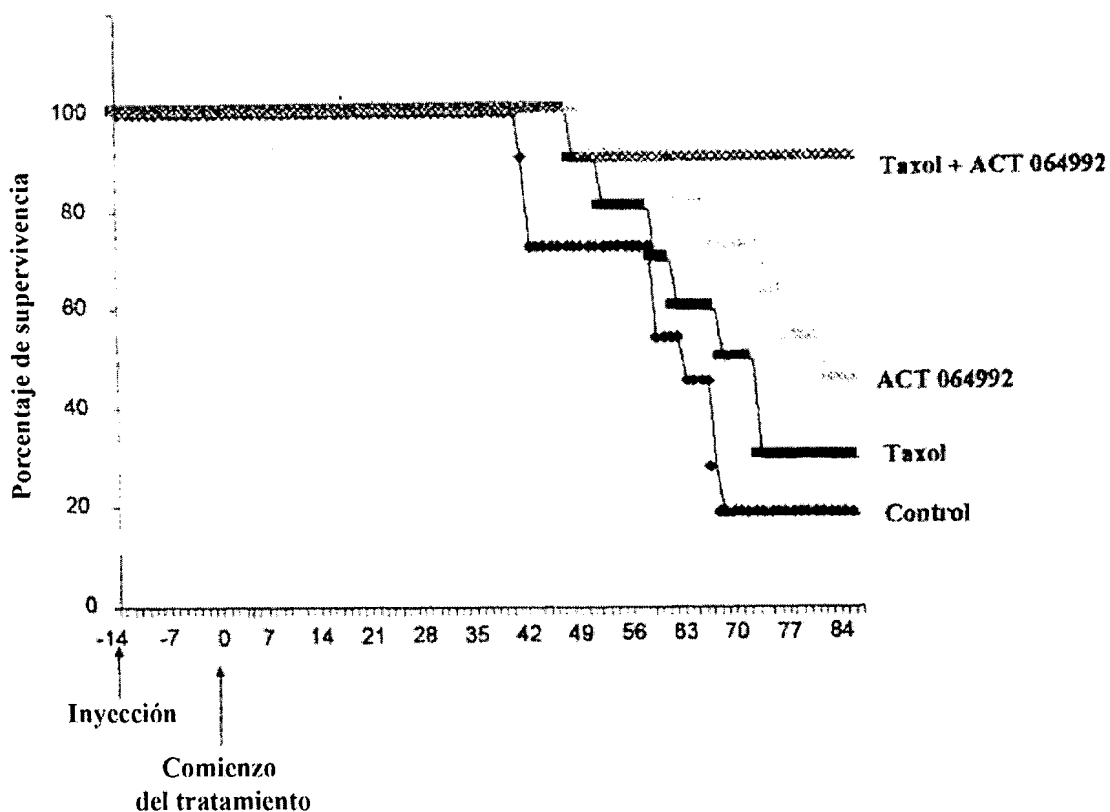
ACT064992: 51, 63, 68, 75, 78, 82

Paclitaxel + ACT: 48

10

WO 2011/019630

PCT/US2010/044832



Prueba para la determinación de ET_A o ET_B IC_{50} :

- 15 Para estudios de competición de ligadura, se utilizan membranas de células CHO que expresan receptores humanos recombinantes ET_A o ET_B . Se preparan membranas microsomales de células recombinantes CHO y el ensayo de ligadura se hace como se describió previamente (Breu V., et al, *FEBS Lett.* (1993), **334**, 210).

000056

La prueba se realizó en 200 µL 50 mM de amortiguador Tris/HCl, pH 7.4, que incluye 25 mM de MnCl₂, 1 mM de EDTA y 0.5% (p/v) de BSA en placas de polipropileno de microtituladores. Las membranas que contienen 0.5 ug de proteína se incubaron por 2 horas, a 20°C, con 8 pM [¹²⁵ I]ET-I (4000 cpm) y concentraciones crecientes de los antagonistas sin marcación. Se estimaron las ligaduras máxima y mínima en muestras sin y con 100 nM ET-1, respectivamente. Después de 2 horas, las membranas se filtraron sobre placas para filtración que contienen filtros GF/C (Uniplacas de filtración de Canberra Packard S.A. Zurich, Suiza). A cada pozo se le adicionan 50 µL de coctel de centelleo (MicroScint 20, Canberra Packard S.A. Zurich, Suiza) y se hace el conteo de las placas de filtración en un contador de microplaca (TopCount, Canberra Packard S.A. Zurich, Suiza).

Todos los compuestos de la prueba se disuelven, diluyen y adicionan en DMSO. La prueba se corre en la presencia de DMSO al 2,5% que se ha encontrado que no interfiere significativamente con la ligadura. IC₅₀ se calcula como la concentración del antagonista que inhibe el 50% de la ligadura específica de ET-1.

Referencias precedenteso:

1. HAM Mucke "Small-molecule endothelin receptor antagonists: A review of patenting activity across therapeutic areas" *IDrugs* 2009 12:366-375.
2. Yoshimine T, et al. (1985) Immunohistochemical study of metastatic brain tumors with astroprotein (GFAP), a glia-specific protein. Tissue architecture and the origin of blood vessels. *J Neurosurg* 62: 414-418.
3. Nelson JB, et al., Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*. 2008 Nov 1;113(9):2376-8.

. 000057

4. Chiappori AA, et al. Phase I/II study of atrasentan, an endothelin A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1464-

5 9.

5. Carden CP, et al., Eligibility of patients with brain metastases for phase I trials: time for a rethink? *The Lancet Oncology*, Volume 9, Issue 10, Pages 1012 - 1017, October 2008 doi:10.1016/S1470-2045(08)70257-2.

10

6. Johanna A. Joyce¹ & Jeffrey W. Pollard, Microenvironmental regulation of metastasis, *Nature Reviews Cancer* 9, 239-252 (April 2009) | doi:10.1038/nrc2618

15 7. Cavaliere R. and Schiff D., Chemotherapy and cerebral metastases: misperception or reality? *Neurosurg Focus* . 2007 Mar 15;22(3):E6.

8. Vatter H, et al., Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation. *J Neurosurg*. 2005 Jun;102(6):1108-14.

20

9. Iglarz M, et al., Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist, *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Dec;327(3):736-45. Epub 2008 Sep 9.

25

10. WO 02/053557

000058

Referencias Técnicas:

- S. Yano et al. Clin. Cancer Res. 6, 957-965 (2000).
- S. J. Kim et al. J Natl. Cancer Inst. 98, 783-793 (2006).
- 5 D. Chelouche Lev et al. Clin. Cancer Res. 11, 306-314 (2005).
- R. R. Langlely et al. Cancer Res. 64, 3727-3730 (2004).
- T. Dull et al. J Virol. 72, 8463-8471 (1998)
- J. Galipeau et al. Cancer Res. 59, 2384-2394 (1999).
- L. Zamai et al. Cytometry 44, 57-64 (2001).
- 10 D. Fan et al. Cancer Res. 50, 3619-3626 (1990).
- M. H. Wade, J. E. Trosko, M. Schindler, Science 232, 525-528 (1986).
- J. H. Lin et al. Nat. Neurosci. 1, 494-500 (1998).
- P. C. Fonseca et al. Cytometry 69A, 487-493 (2006).
- B. M. Bolstad, R. A. Irizarry, M. Astrand, T. P. Speed, Bioinformatics 19, 185-193
- 15 (2003).
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (July 1991). "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture." *Cancer communications* 3 (7): 207-12.
- 20 Clinical trials: a practical guide to design, analysis and reporting Edited by Ameet Bakhai and Duolao Wang. Remedica, London 2005.
- Negoescu A, et al., J Histochem Cytochem. 1996 Sep;44(9):959-68.
- Todas las referencias citadas o de otras formas identificadas en este documento están
- 25 incorporadas por este medio en referencia a su totalidad, y particularmente para la información específica para la cual se citan.

000059

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor de la endotelina para uso en la prevención o el tratamiento de la metástasis cerebral en combinación con un agente quimioterapéutico citotóxico, radioterapia o ambos.
2. Un antagonista del receptor de la endotelina para uso en la prevención o el tratamiento de la metástasis cerebral de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un antagonista dual del receptor de la endotelina.
3. Un antagonista del receptor de la endotelina para uso en la prevención o el tratamiento de la metástasis cerebral de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, el cual se selecciona de un grupo que está compuesto por bosentan, macitentan y una mezcla de bosentan y macitentan.
4. Un antagonista del receptor de la endotelina para uso en la prevención o el tratamiento de la metástasis cerebral de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el antagonista del receptor de la endotelina se selecciona de un grupo que está compuesto por bosentan, macitentan y una mezcla de ellos y es para uso con un agente quimioterapéutico citotóxico.
5. Un antagonista del receptor de la endotelina para uso en la prevención o el tratamiento de la metástasis cerebral de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente citotóxico quimioterapéutico se selecciona de un grupo que está compuesto por paclitaxel, temozolomida y una mezcla de paclitaxel y temozolomida.

000060

6. Un antagonista del receptor de la endotelina para uso en la prevención o el tratamiento de la metástasis cerebral de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el antagonista del receptor de la endotelina se selecciona de un grupo que está compuesto por bosentan, macitentan y una mezcla de bosentan y macitentan.
7. Un método para inhibir la protección mediada por astrocitos célula de metástasis cerebral a partir de la muerte de células inducida por quimioterapia citotóxica, el método comprende la etapa de la administración de una cantidad efectiva de un antagonista del receptor de la endotelina a la célula cerebral metastásica y el astrocito para inhibir la protección mediada de astrocitos.
8. Un método de inhibición de una protección mediada de astrocitos de una célula cerebral metastásica a partir de la muerte de células inducida por quimioterapia citotóxica, el método comprende la etapa de la administración de una cantidad efectiva de un antagonista del receptor de la endotelina a la célula cerebral metastásica y el astrocito para inhibir la protección mediada por astrocitos y además para supersensibilizar la célula cerebral metastásica a la muerte celular inducida por quimioterapia citotóxica.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, que comprende además la etapa de la administración de al menos un agente citotóxico quimioterapéutico a la célula cerebral metastásica.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la célula cerebral metastásica se compone bien sea de un tumor cerebral metastásico existente en un individuo o la célula cerebral metastásica es una célula aislada.

000061

11. El método de la reivindicación 9 o 10 en donde el agente citotóxico quimioterapéutico es al menos uno entre paclitaxel, doxorubicina, vinblastina, vincristina, 5-fluoro-uracilo, cisplatina, ciclofosfamida, etoposida, teniposida, mitomicina, irinotecan, vinorelbina, ifosfamida, y/o temozolomida.
12. El método de una de las reivindicaciones 7 a 11 en donde el antagonista del receptor de la endotelina es uno o más entre macitentan, sitaxentan, tezosentan, clazosentan, abbrisentan, bosentan y/o atrasentan.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde el individuo es un humano y además comprende opcionalmente la etapa para la administración de un tratamiento estándar de cuidado paliativo y/o terapéutico del tumor cerebral metastásico existente en el individuo humano.
14. El método de la reivindicación 13, en donde se proporciona el tratamiento estándar de cuidado terapéutico y el tratamiento estándar de cuidado terapéutico es uno o los dos de la totalidad de radioterapia cerebral o radiocirugía estereotáctica.
15. Un método de tratamiento de un tumor cerebral metastásico existente en un individuo que comprende la administración a dicho individuo de una combinación de un antagonista del receptor de la endotelina y al menos un agente citotóxico quimioterapéutico.
16. Un ratón que tiene un tumor humano con metástasis cancerosa celular cerebral, el ratón además contiene a) al menos un agente citotóxico

000062

quimioterapéutico en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar el tumor humano con metástasis cancerosa cerebral y b) al menos un antagonista del receptor de la endotelina en una cantidad suficiente para inhibir una protección mediada por astrocitos del tumor humano con metástasis cancerosa cerebral.

17. Un complejo celular aislado de celular de cáncer de células de astrocito en donde una célula aislada de astrocito está en comunicación por unión en hendidura con una célula aislada cancerosa.

18. El complejo celular aislado de cáncer de células de astrocito de la reivindicación 17 en donde la célula aislada de astrocito es un astrocito murine y la célula aislada cancerosa es una célula humana cancerosa.

19. El complejo celular aislado de celular de cáncer de células de astrocito de la reivindicación 18 en donde la línea celular de cáncer aislada es la célula MDA-MB-231 o PC14Br₄.

20. Un método para formar un complejo celular aislado de celular de cáncer de astrocito que comprende las etapas de a) proporcionar una célula aislada de astrocito, b) proporcionar una célula cancerosa, c) co-cultivar las células proporcionadas por un tiempo suficiente para formar una unión de hendidura entre las células y de esa manera forman el complejo celular con cáncer – célula de astrocito.

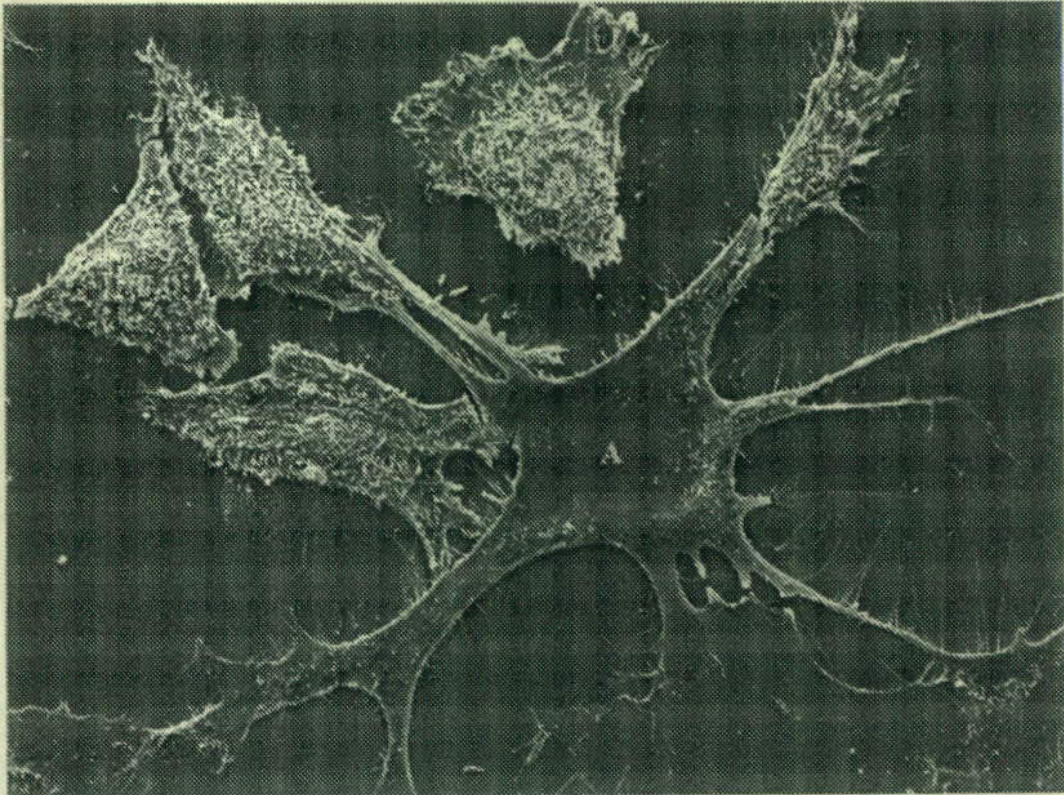
21. El método de la reivindicación 20 en donde la célula aislada de astrocito es un astrocito murine y la célula aislada cancerosa es una célula humana

cancerosa.

22. El método de la reivindicación 21 en donde la línea celular de cáncer aislada es MDA-MB-231 o PC14Br₄.
23. El método de la reivindicación 20, 21 o 22, que comprende además la etapa de la adición de uno o más agentes candidatos quimioterapéuticos para evaluar el grado de protección mediada por astrocitos contra los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos.
24. El método de la reivindicación 23, que comprende además la etapa de realización de un paso de diagnóstico molecular para proporcionar un perfil de identificación molecular que corresponde a la protección mediada por astrocitos contra los efectos citotóxicos del agente quimioterapéutico.
25. El método de la reivindicación 24 en donde el paso del diagnóstico molecular es una o más de las medidas diferenciales de la expresión del gen o una medida diferencial de la concentración de la proteína celular.
26. El método de la reivindicación 25 en donde la medida diferencial de la expresión del gen se lleva a cabo utilizando un chip de genes.

000064

FIGURA 1



000065

FIGURA 2

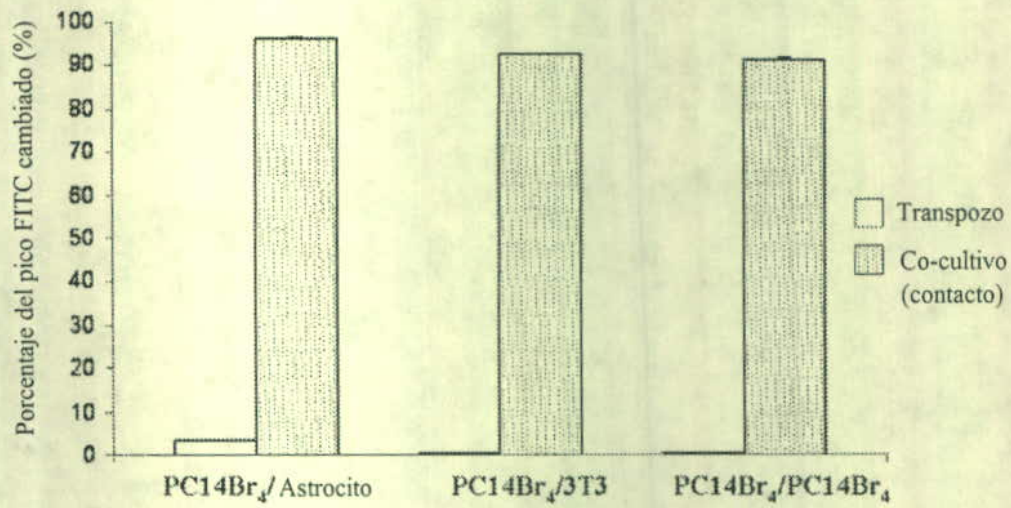
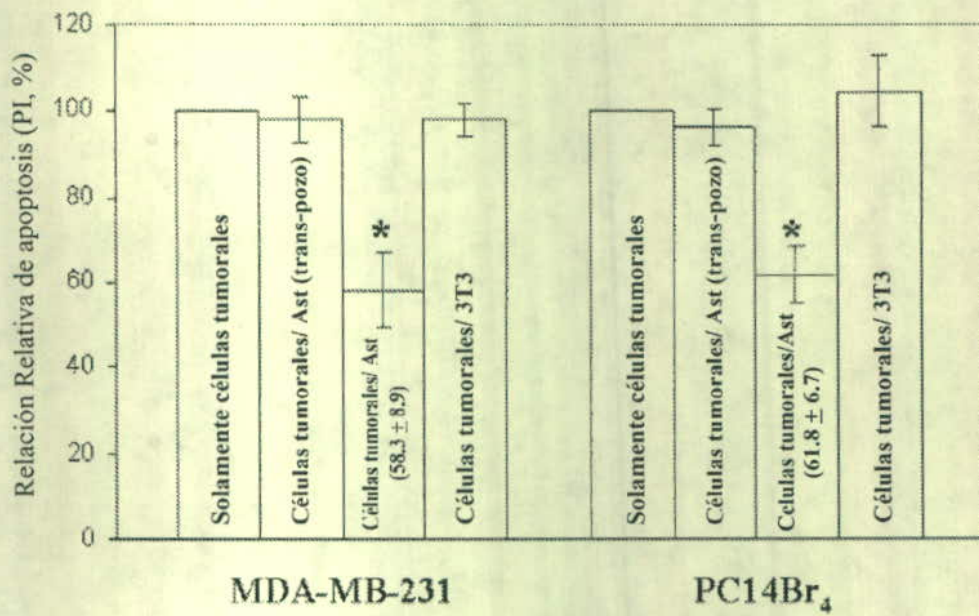
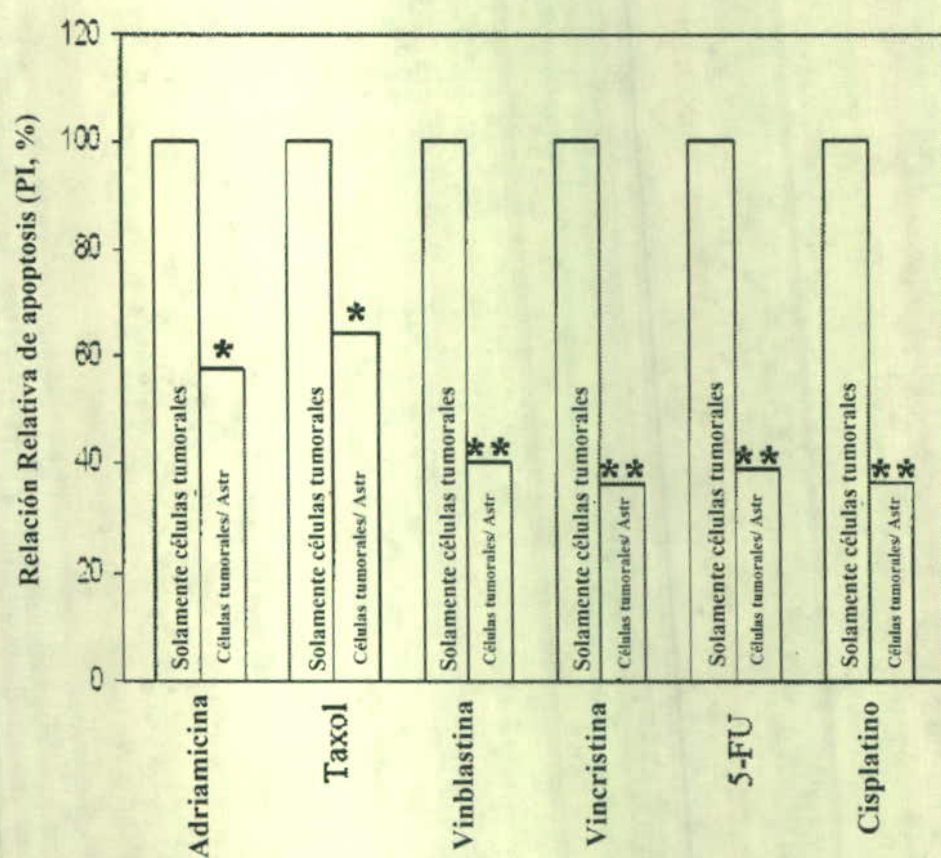


FIGURA 3



000006

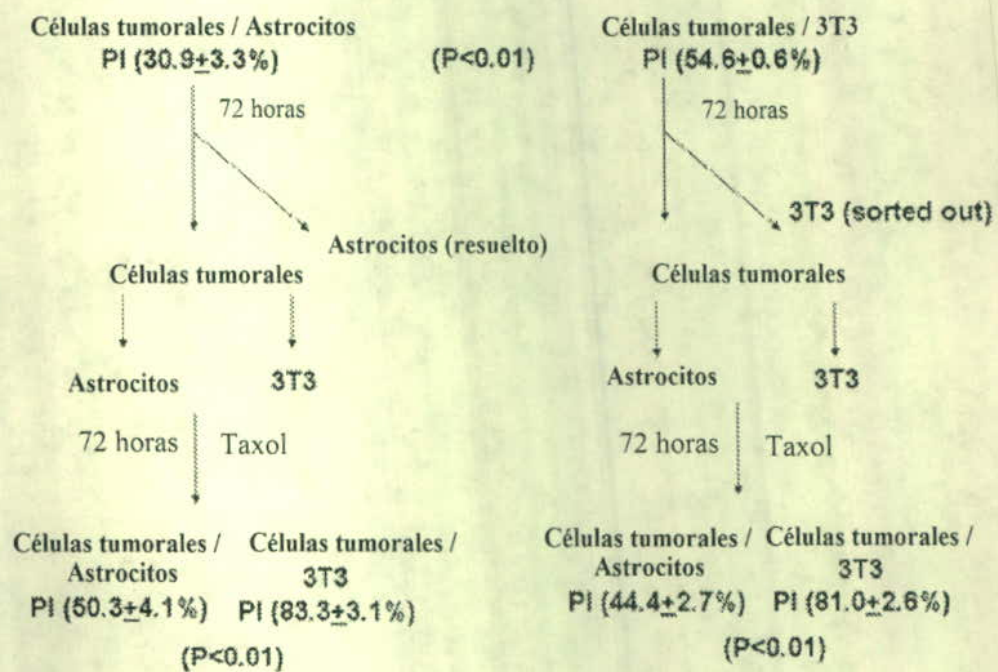
FIGURA 4



000067

FIGURA 5

PROTECCIÓN MEDIADA POR ASTROCITOS DE CÉLULAS TUMORALES DE QUIMIOTERAPIA



000068

FIGURA 6

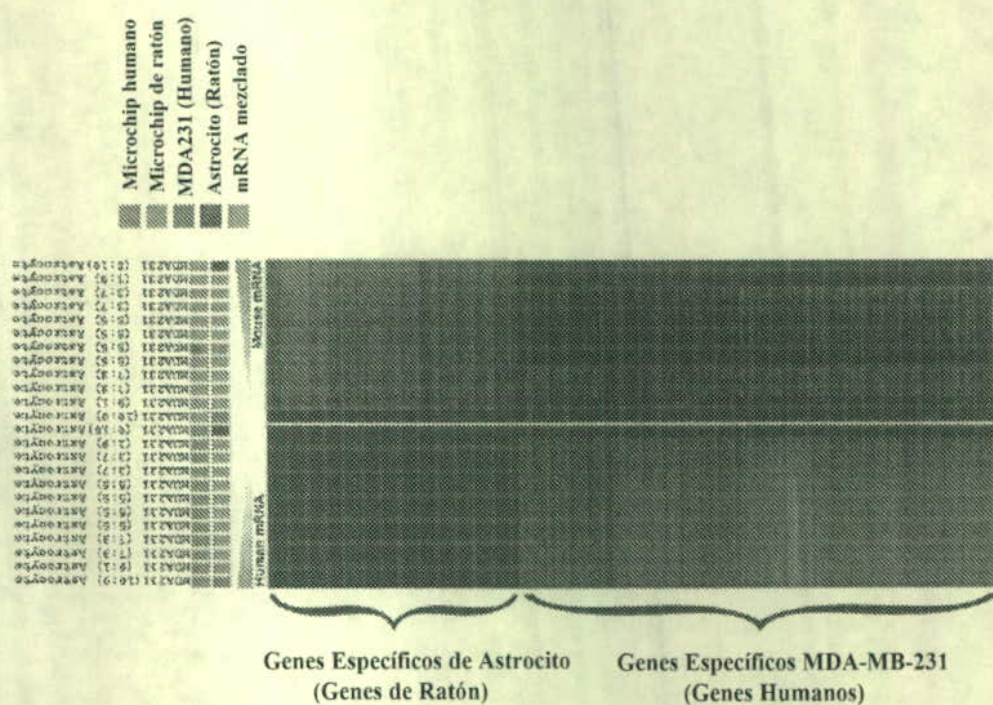


FIGURA 7

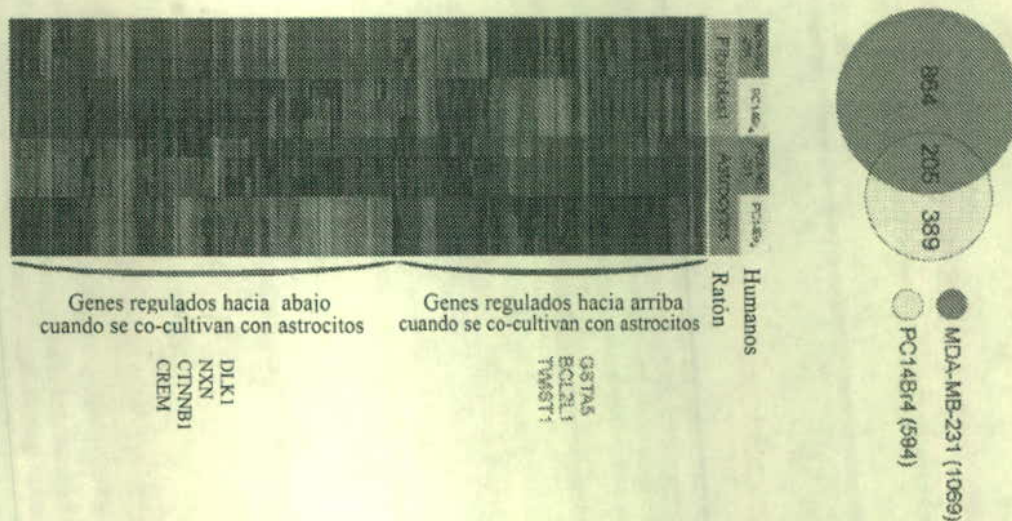


FIGURA 8

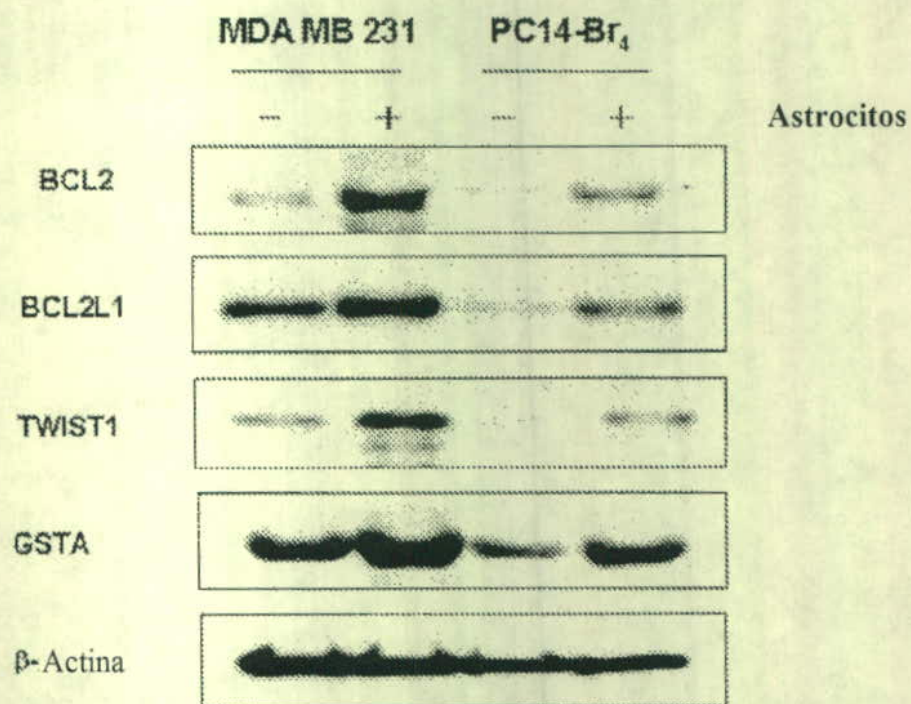
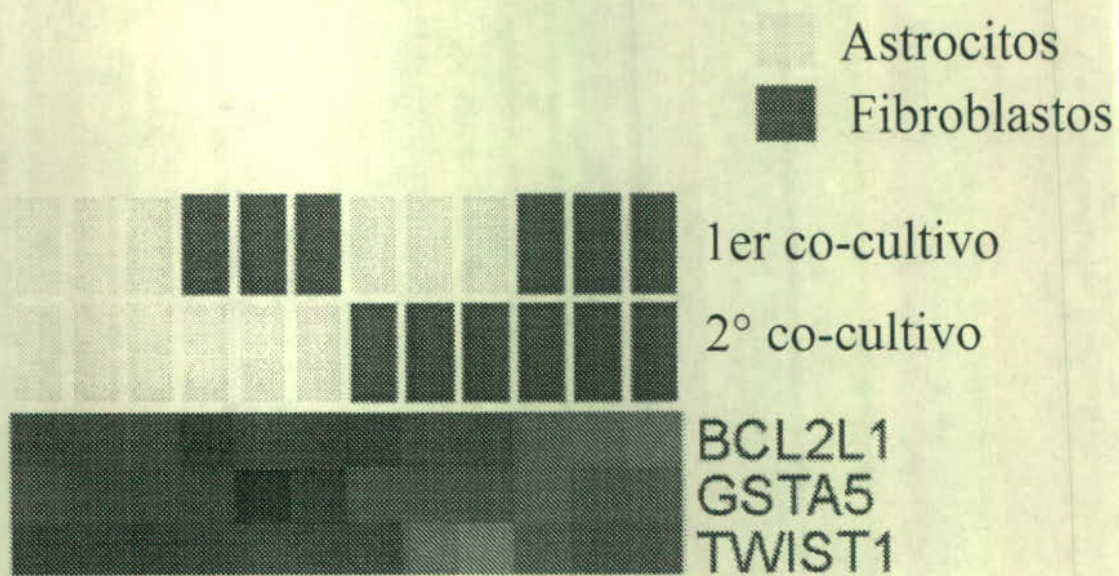


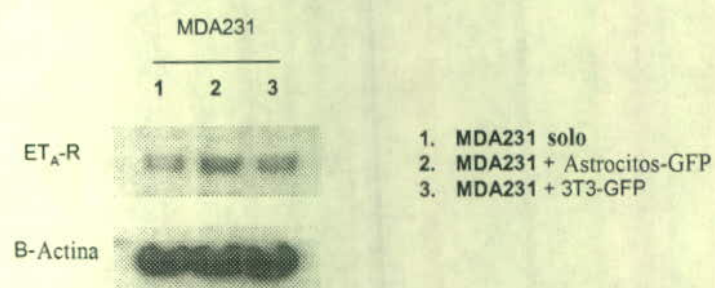
FIGURA 9



000070

FIGURA 10

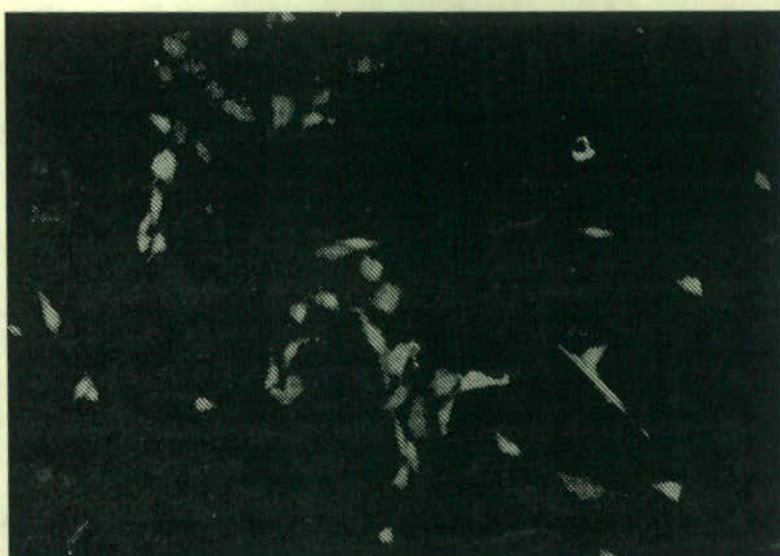
Expresión aumentada de ET_A-R en las células humanas de cáncer de seno MDA231
co-cultivadas con astrocitos pero sin fibroblastos (3T3)



000071

FIGURA 11

Expresión de pKAT por MDA231 células humanas de cáncer de seno
co-cultivadas con astrocitos/Taxol



Verde= MDA231
Rojo= pAkt
Azul= núcleo

000072

FIGURA 12

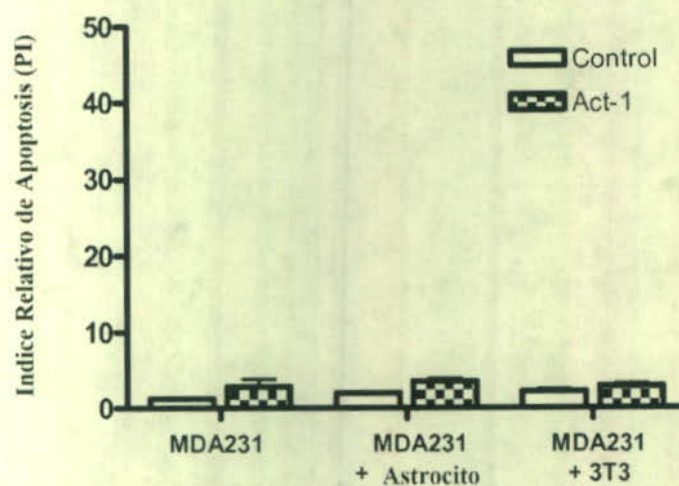
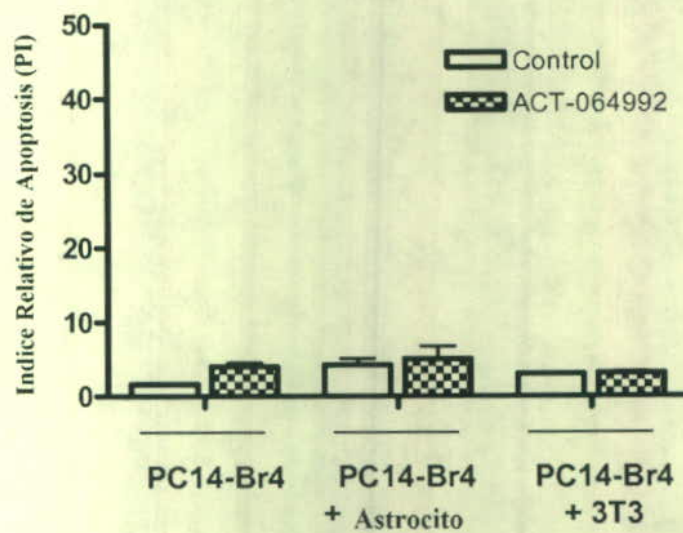


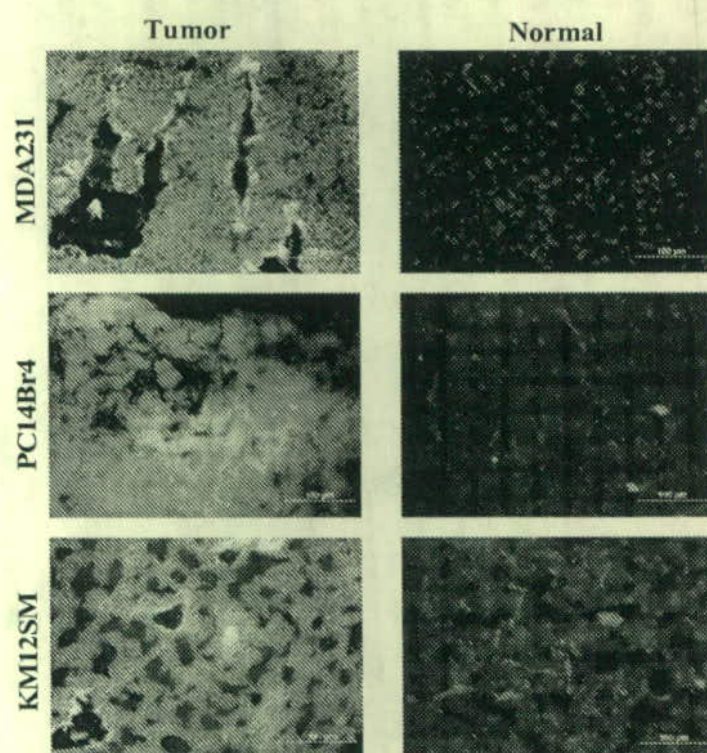
FIGURA 13



000073

Modelo de Ratón
CD31/ET_A/DAPI

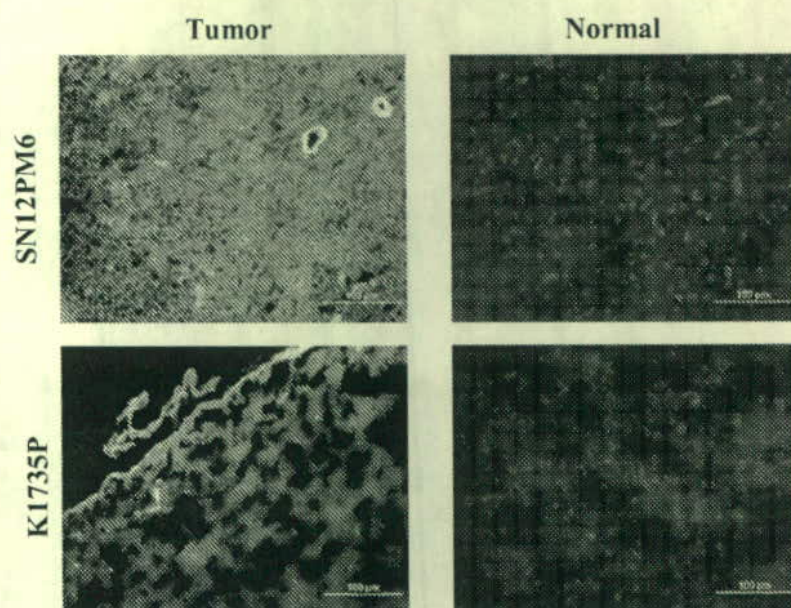
FIGURA 14A



000074

FIGURA 14B

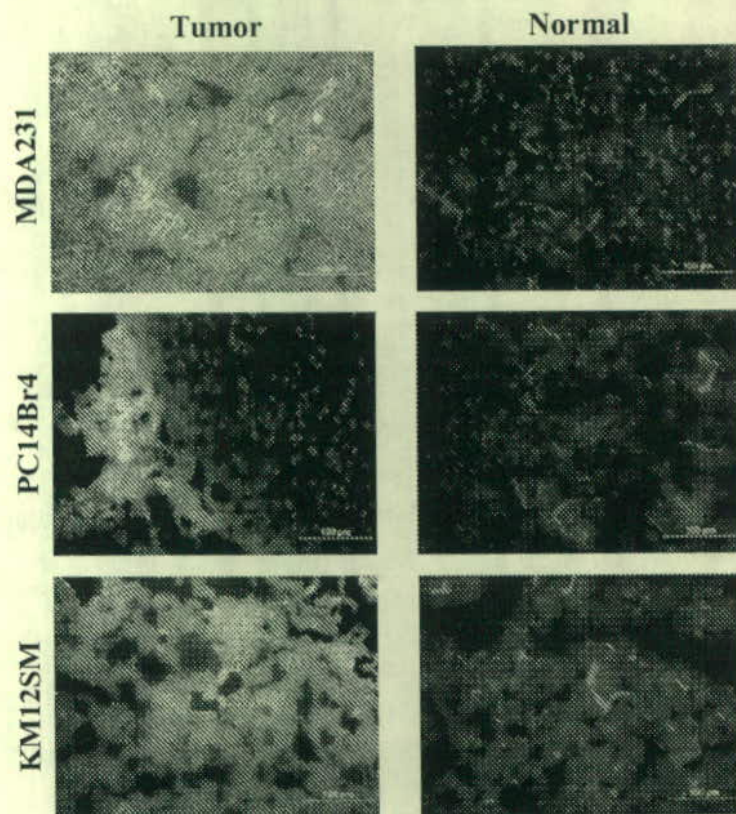
Modelo de Ratón
CD31/ET_AR/DAPI



000075

FIGURA 14C

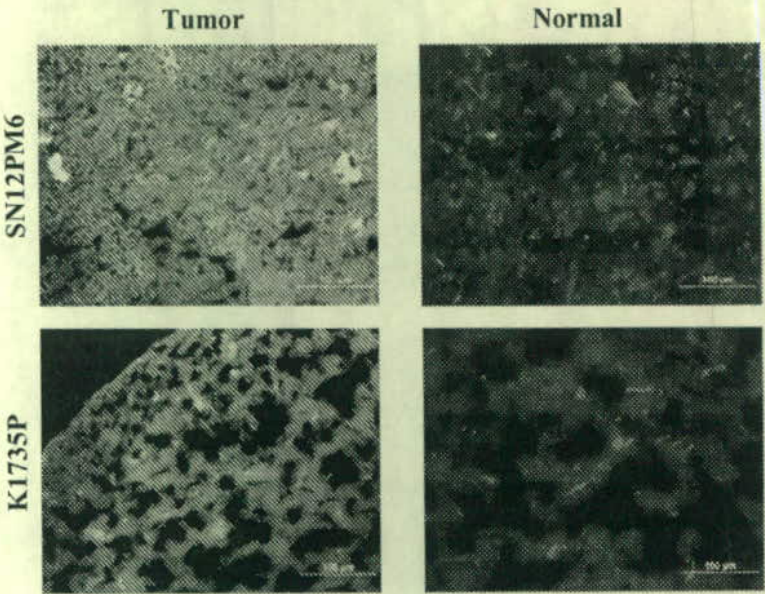
Modelo de Ratón
CD31/ET_BR/DAPI



000076

FIGURA 14D

Modelo de Ratón
CD31/ET_BR/DAPI



000077

FIGURA 15

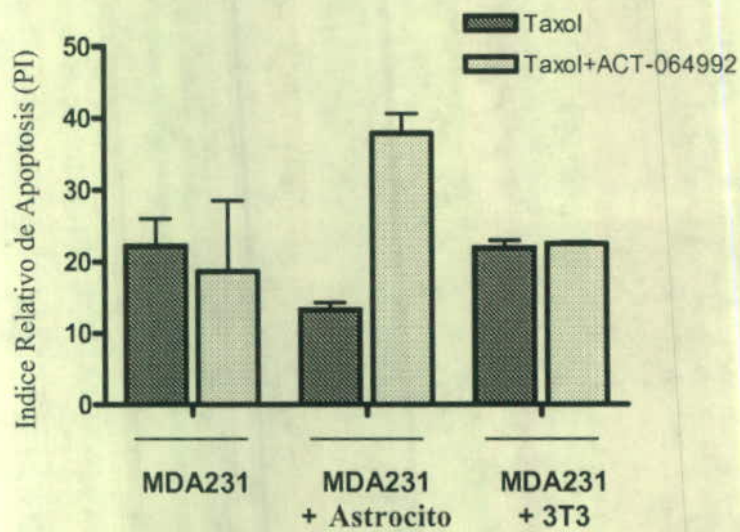
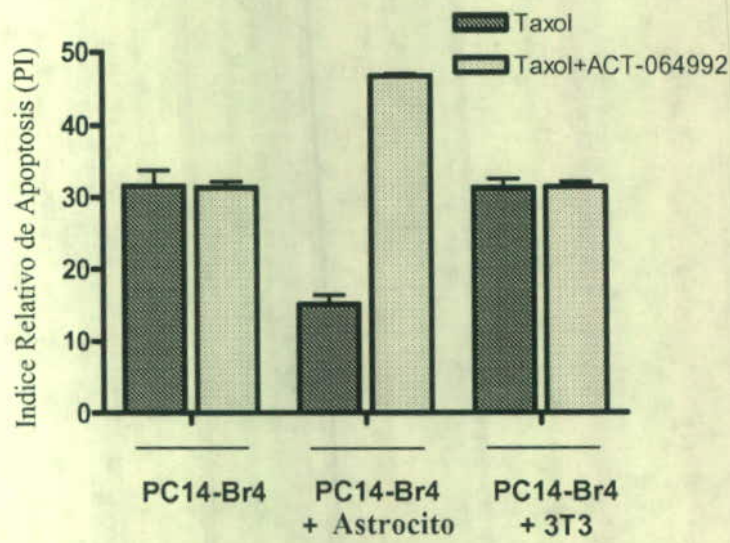


FIGURA 16



000078

FIGURA 17

Análisis Inmunohistoquímico

MDA231/ Astrocitos /Taxol MDA231/ Astrocitos /Taxol/Act-064992

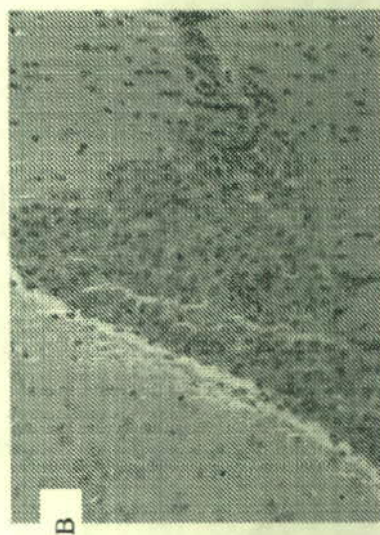


Verde = MDA231
Rojo = pAkt
Azul = Núcleo

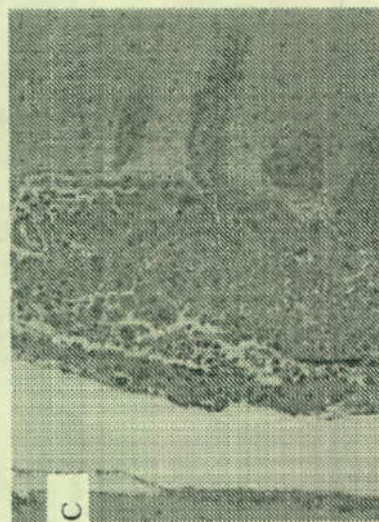
Control



Temozolomida



ACT-064992



ACT-064992/ Temozolomida

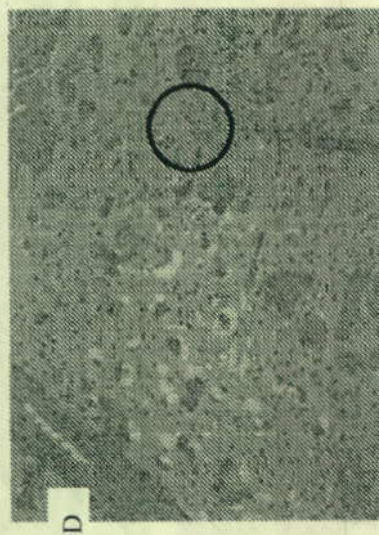


FIGURA 18 A-D

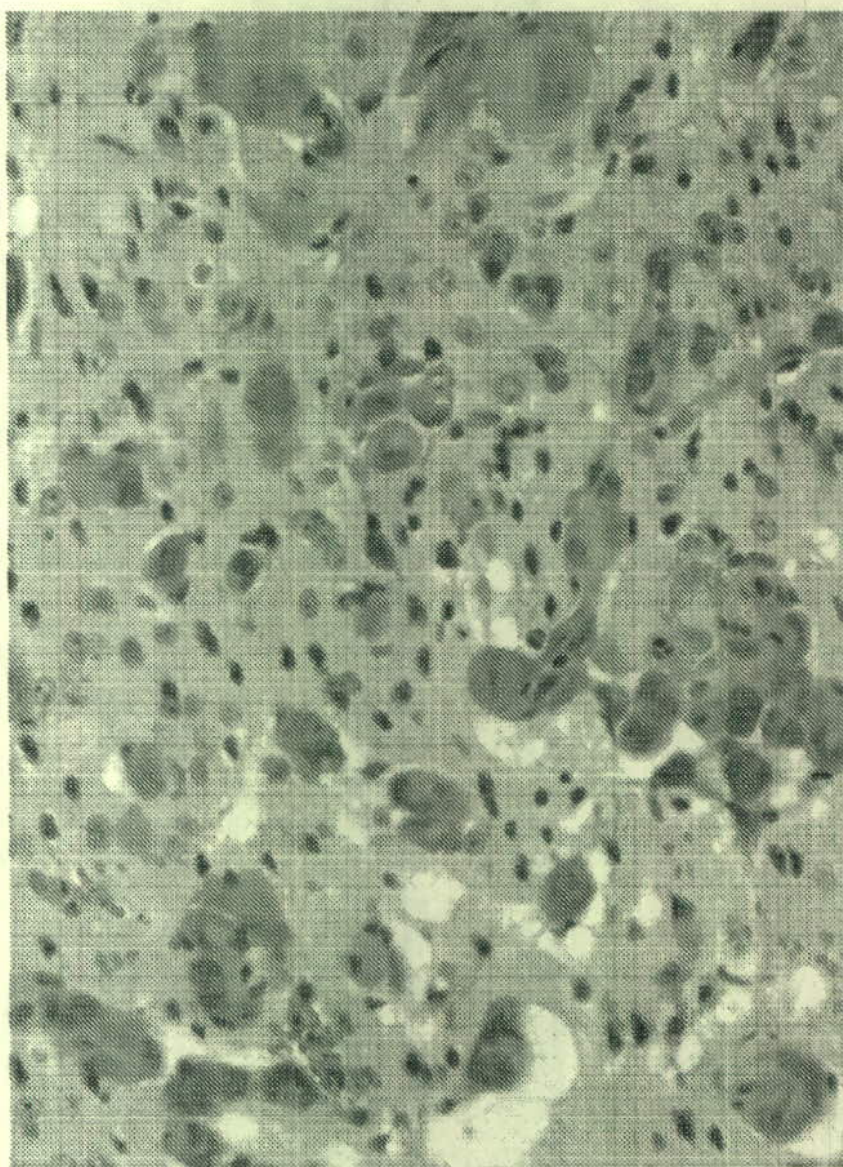


FIGURA 18E

FIGURA 19

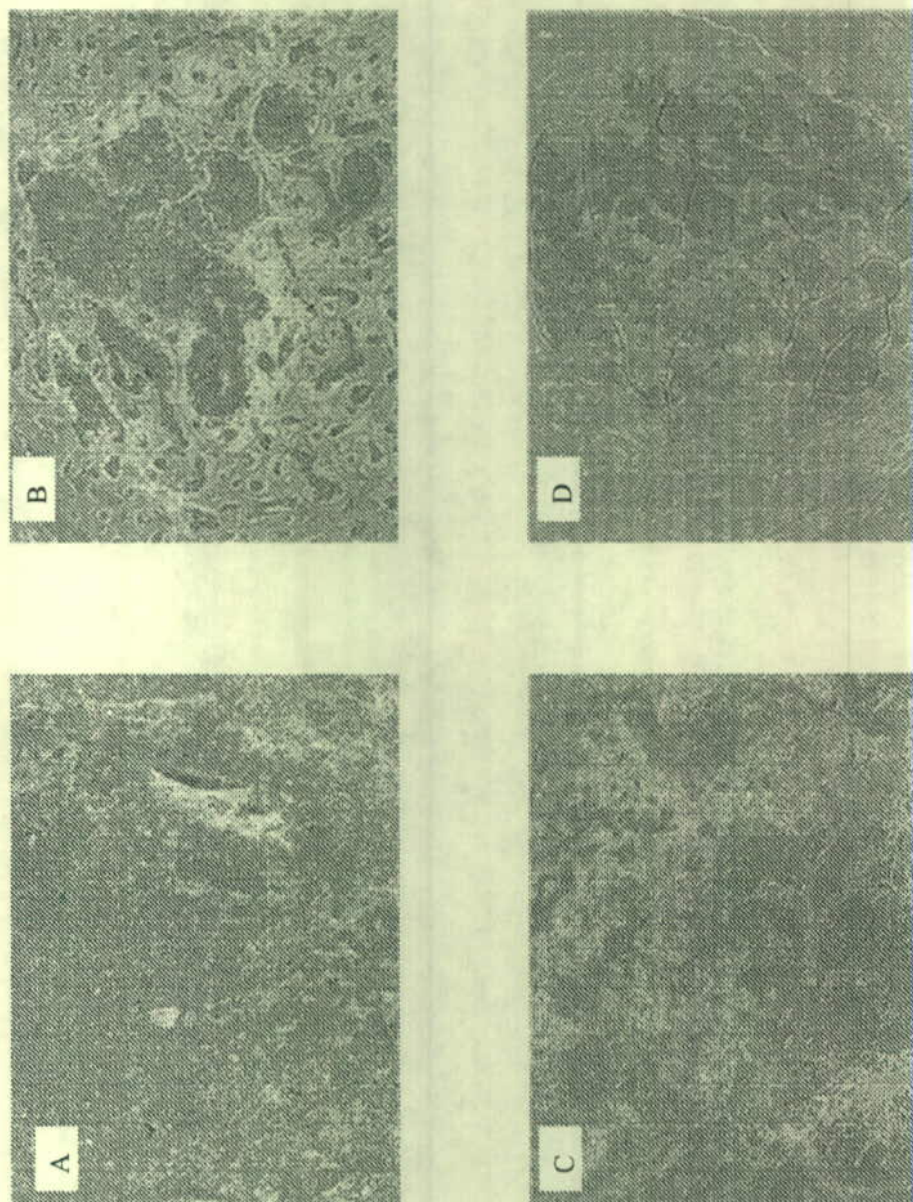
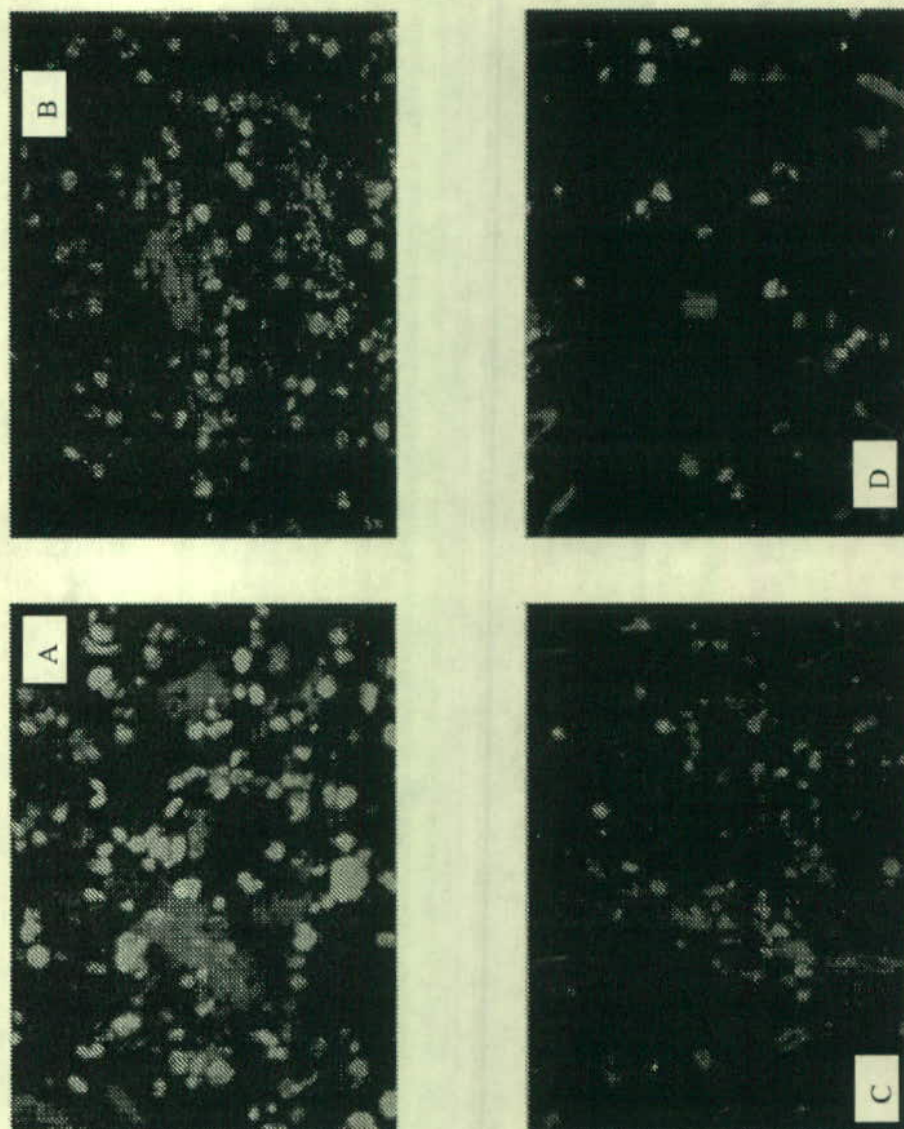


FIGURA 20



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

000083

FIGURA 21



B



D



A



C

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

000087

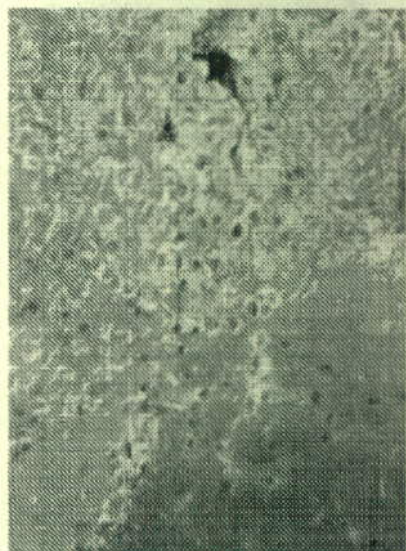
FIGURA 22



A



B



C



D

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

000085

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
17 February 2011 (17.02.2011)



(10) International Publication Number
WO 2011/019630 A3

(51) International Patent Classification:

A01K 67/00 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2010/044832

(22) International Filing Date:

9 August 2010 (09.08.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/232,687 10 August 2009 (10.08.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM** [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **FIDLER, Isalah, J.** [US/US]; 7515 S. Main, Suite 490, Houston, TX 77030 (US). **KIM, Sun-jin** [KR/US]; 7515 S. Main, Suite 490, Houston, TX 77030 (US).

(74) Agents: **SISTRUNK, Melissa et al.**; Fulbright & Jaworski L.L.P., Fulbright Tower, 1301 McKinney, Suite 5100, Houston, TX 77010-3095 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

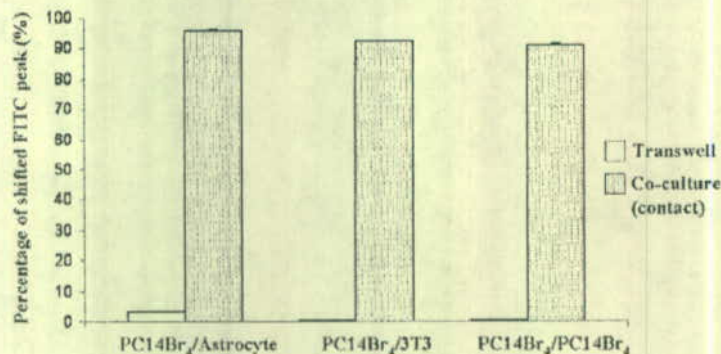
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(88) Date of publication of the international search report:

3 June 2011

(54) Title: TREATMENT OF BRAIN METASTASES WITH INHIBITORS OF ENDOTHELIN RECEPTORS IN COMBINATION WITH A CYTOTOXIC CHEMOTHERAPY AGENT

FIGURE 2



000086

(57) Abstract: The disclosure relates to an endothelin receptor antagonist for use in the prevention or treatment of brain metastases in combination with a cytotoxic chemotherapy agent, radiotherapy or both. The endothelin receptor antagonist may for example be bosentan, macitentan or a mixture of bosentan and macitentan.

WO 2011/019630 A3