



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-070938- -00014-0000
Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 103

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-104695- -00000-0000
Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
TRATAMIENTO DE CANCER E DE MAMA CON UN

INHIBIDOR DE PARP SOLO O EN

COMBINACION CON AGENTES ANTI-TUMORALES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____
BIPAR SCIENCES, INC.

DOMICILIO _____
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA,

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-070938- -00014-0000

Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI cación
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 103

DIRECCIÓN DE
CONVERSIÓN, DIVISIÓN

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

☒ División

☐ Fusión

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5

No. 13-104695- -00000-0000

Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

BIPAR SCIENCES, INC.

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	400 Oyster Point Boulevard, Suite 200, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América	South San Francisco
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre

De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación

C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional

T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 -35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

DIVISION

Expediente : 10.070.938
De: _____
A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

5. Comprobante de Pago No 13-0035796 Fecha : 2013/04/16
Comprobante de Pago No 13-0037823 Fecha : 2013/04/23

6. Anexos

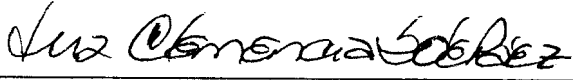
☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$450.000.

☒ Comprobante de pago por 13 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$390.000

☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

AHAIAHAINCAID-AF240464WPC17136

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 10.070.938.. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 11 de junio de 2010 y la prioridad que allí se reivindica el 12 de Noviembre de 2007.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 10.070.938

TRATAMIENTO DE CÁNCER DE MAMA CON UN INHIBIDOR DE PARP SOLO O EN COMBINACIÓN CON AGENTES ANTI-TUMORALES

REFERENCIA CRUZADA

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EEUU No. 60/987.333, titulada “Treatment of Triple Negative Metastatic Breast Cancer with a Combination of an Antimetabolite, a Platinum Complex, and a PARP Inhibitor” presentada el 12 de noviembre, 2007 (No. de Expediente del Abogado 28825-742.101); Solicitud Provisional de EEUU No. 61/012.364, titulada “Treatment of Cancer with Combinations of Topoisomerase Inhibitors and PARP Inhibitors” presentada el 7 de diciembre, 2007 (No. de Expediente del Abogado 28825-747.101); y Solicitud Provisional de EEUU No. 61/058.528, titulada “Treatment of Breast, Ovarian, and Uterine Cancer with a PARP Inhibitor” presentada el 3 de junio, 2008 (No. de Expediente del Abogado 28825-757.101), cada una de dichas solicitudes se incorpora en la presente memoria en su totalidad por referencia.

ANTECEDENTES

[0002] El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por el control aberrante del crecimiento celular. Se estima que la incidencia anual del cáncer es mayor de 1,3 millones sólo en los Estados Unidos. Aunque para tratar el cáncer se usan cirugía, radiación, quimioterapia, y hormonas, permanece como la segunda causa principal de muerte en los EEUU. Se estima que más de 560.000 Americanos morirán de cáncer cada año.

[0003] Las células cancerosas activan simultáneamente varias rutas que regulan positivamente y negativamente el crecimiento celular y la muerte celular. Este rasgo sugiere que la modulación de las señales de muerte y supervivencia celulares podría proporcionar nuevas estrategias para mejorar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos actuales.

[0004] El cáncer de mama se trata generalmente con una combinación de cirugía para eliminar la lesión cancerosa y terapia adyuvante – radiación, quimioterapia o ambas – para atacar cualquier célula cancerosa que pueda haber quedado después de la cirugía. El cáncer de mama puede clasificarse en términos generales por la presencia o ausencia de receptores hormonales (HR). El cáncer positivo para receptores hormonales (HR+) se caracteriza por la expresión de uno o los dos receptores hormonales femeninos – receptor de estrógeno (ER) o receptor de progesterona (PR). La terapia adyuvante para el cáncer de mama ER+ incluye a menudo quimioterapia con un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM), tal como tamoxifeno o raloxifeno. Desafortunadamente, aunque aproximadamente el 70% de los cánceres de mama son ER positivos, el 30% restante de los cánceres de mama que son HR negativos no son susceptibles de tratarse con SERM. De acuerdo con esto, se han intentado otras quimioterapias adyuvantes, tal como tratamiento con una antraciclina (sola o en combinación con un taxano) en cáncer de mama ER negativo.

[0005] El tratamiento con antraciclina está limitado por límites de dosificación de por vida basado en problemas de cardiotoxicidad. El tratamiento con gemcitabina y carboplatino es una quimioterapia de combinación establecida para los pacientes con cáncer de mama metastásico – ya sea sin tratar con taxano o pre-tratados con taxano. Los agentes de platino han demostrado una actividad antitumoral prometedora en cánceres de mama localmente avanzados similares al basal. Los agentes que dañan el ADN tienen una eficacia antitumoral prometedora frente a cánceres de mama similares al basal debido a los defectos en las rutas de reparación del ADN inherentes a estos cánceres de mama.

[0006] A pesar de la disponibilidad de antimetabolitos tales como gemcitabina y agentes de complejos de platino tales como carboplatino, no existe una atención médica estándar aceptada para el cáncer de mama ER negativo. En particular, el cáncer de mama metastásico triple negativo (es decir, el cáncer de mama que es ER negativo, y/o PR negativo, y/o negativo para el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano

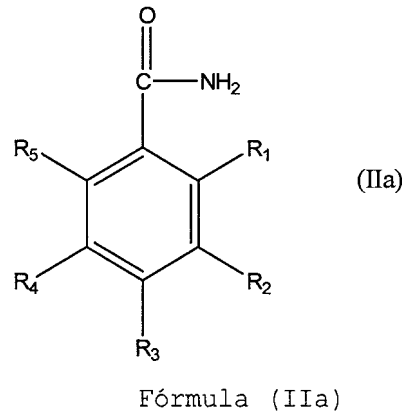
(HER2)) es resistente a los tratamientos estándar y es totalmente resistente a quimioterapia con SERM. Existe así una necesidad de un tratamiento eficaz para el cáncer en general, y especialmente para el cáncer de mama metastásico triple negativo.

[0007] Aunque existen opciones terapéuticas limitadas para el tratamiento del cáncer, las variantes de cánceres, incluyendo el cáncer de mama triple negativo, son especialmente difíciles porque pueden ser resistentes al tratamiento quimioterapéutico u hormonal estándar. Existe así una necesidad de un tratamiento eficaz para el cáncer en general, y las variantes de cáncer en particular.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0008] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama que es negativo para al menos uno de ER, PR, o HER2 en un paciente, que comprende administrar al paciente al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama que es negativo para al menos uno de ER, PR, o HER2 en un paciente que lo necesita, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar cada uno de lo siguiente: si el cáncer es ER-positivo o ER-negativo; si el cáncer es PR-positivo o PR-negativo; si el cáncer es HER2-positivo o HER2-negativo; (c) si el ensayo indica que el cáncer es negativo para al menos uno de ER, PR, o HER2, tratar al paciente con al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, el método comprende además tratar al paciente con al menos un inhibidor de PARP, si se cumplen dos o más de las condiciones siguientes: (a) el cáncer es ER-negativo, (b) el cáncer es PR-negativo, (c) el cáncer es HER2-negativo. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama que es negativo para al menos uno de ER, PR, o HER2 en un paciente, que comprende: (a) ensayar una muestra del paciente para la expresión de PARP; y (b) si la expresión de PARP supera un nivel predeterminado, administrar al paciente al menos un inhibidor de PARP.

[0009] Practicando cualquiera de los métodos de referencia descritos en la presente memoria, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable, o una respuesta patológica completa. En algunas realizaciones, se obtiene una tasa de beneficio clínico comparable (CBR = CR + PR + SD ≥ 6 meses) con el tratamiento con el inhibidor de PARP comparado con el tratamiento con un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 30% comparado con el tratamiento con un agente anti-tumoral solo. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es un inhibidor de PARP-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP 1 es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP tiene la Fórmula (IIa) o un metabolito de éste:



en la que bien: (1) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre un sustituyente que contiene azufre, y los sustituyentes restantes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, amino, nitro, yodo, bromo, flúor, cloro, alquilo ($C_1 - C_6$), alcoxi

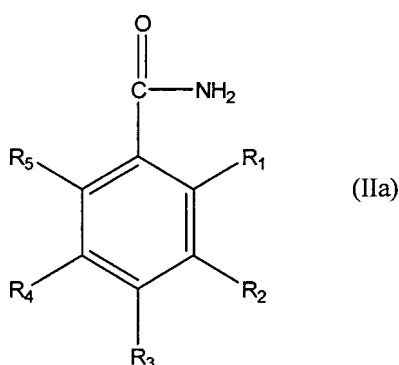
($C_1 - C_6$), cicloalquilo ($C_3 - C_7$), y fenilo, en la que al menos dos de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 son siempre hidrógeno; o (2) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 no es un sustituyente que contiene azufre y al menos uno de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre yodo, y en la que dicho yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , o R_5 que es bien un grupo nitro, nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino; y sales solvatos, isómeros, tautómeros, metabolitos, análogos, o profármacos farmacéuticamente aceptables de éste. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, o amino.

[0010] En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en estadio I, estadio II, o estadio III. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y en el que el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es deficiente en la reparación del ADN por recombinación homóloga. En algunas realizaciones, el cáncer de mama tiene alterada la función de BRCA1 o BRCA2. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, en el que en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente, como una inyección o infusión parenteral, o inhalación. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento tiene una duración de aproximadamente 11 a aproximadamente 30 días. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con al menos un agente anti-tumoral. El agente anti-tumoral es un agente alquilante antitumoral, antimetabolito antitumoral, antibióticos antitumorales, agente antitumoral obtenido de plantas, complejo de platino antitumoral, derivado de camptotecina antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa antitumoral, anticuerpo monoclonal, interferón, modificador de la respuesta biológica, agente hormonal antitumoral, agente viral anti-tumoral, inhibidor de la angiogénesis, agente de diferenciación, inhibidor de PI3K/mTOR/AKT, inhibidor del ciclo celular, inhibidor de la apoptosis, inhibidor de hsp 90, inhibidor de tubulina, inhibidor de la reparación del ADN, agente anti-angiogénico, inhibidor de la tirosina quinasa de receptores, inhibidor de topoisomerasa, taxano, agente dirigido a Her-2, antagonista hormonal, agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es citabina, capecitabina, valopicitabina o gemcitabina. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral se selecciona del grupo que consiste en Avastina, Sutent, Nexavar, Recentina, ABT-869, Axitinib, Irinotecán, topotecán, paclitaxel, docetaxel, lapatinib, Herceptina, lapatinib, tamoxifeno, un inhibidor de la aromataza esteroideal, un inhibidor de la aromataza no-esteroideal, Fulvestrant, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Cetuximab, Panitumumab, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF1R), y CP-751871. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con más de un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral se administra antes de, junto con o posteriormente a la administración del inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, el método comprende además cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia viral,

terapia de ARN, terapia de ADN, terapia adyuvante, terapia neoadyuvante, inmunoterapia, nanoterapia o una combinación de éstas. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con irradiación gamma. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido o de fluido corporal. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor, una muestra de sangre, una muestra de plasma sanguíneo, una muestra de fluido peritoneal, un exudado o una efusión. En algunas realizaciones, el método comprende además ensayar una muestra del paciente para expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona o receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano.

[0011] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende administrar al paciente al menos un inhibidor de PARP en combinación con al menos un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama en un paciente que lo necesita, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar cada uno de lo siguiente: si el cáncer es ER-positivo o ER-negativo; si el cáncer es PR-positivo o PR-negativo; si el cáncer es HER2-positivo o HER2-negativo; (c) si el ensayo indica que el cáncer es negativo para al menos uno de ER, PR, o HER2, tratar al paciente con una combinación de agentes terapéuticos, en el que los agentes terapéuticos incluyen al menos un inhibidor de PARP y al menos un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, el método comprende además tratar al paciente con una combinación de agentes terapéuticos, en el que los agentes terapéuticos incluyen al menos un inhibidor de PARP y al menos un agente anti-tumoral, si se cumplen dos o más de las condiciones siguientes: (a) el cáncer es ER-negativo, (b) el cáncer es PR-negativo, (c) el cáncer es HER2-negativo. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende: (a) ensayar una muestra del paciente para la expresión de PARP; y (b) si la expresión de PARP supera un nivel predeterminado, administrar al paciente al menos un inhibidor de PARP y al menos un agente anti-tumoral.

[0012] Practicando cualquiera de los métodos de referencia descritos en la presente memoria, en algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable, o una respuesta patológica completa. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico ($\text{CBR} = \text{CR} + \text{PR} + \text{SD} \geq 6$ meses) comparada con el tratamiento con el agente anti-tumoral pero sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP tiene la Fórmula (IIa) o un metabolito de éste:



Fórmula (IIa)

en la que bien: (1) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre un sustituyente que contiene azufre, y los sustituyentes

restantes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, amino, nitro, yodo, bromo, flúor, cloro, alquilo (C_1 - C_6), alcoxi (C_1 - C_6), cicloalquilo (C_3 - C_7), y fenilo, en la que al menos dos de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 son siempre hidrógeno; o (2) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 no es un sustituyente que contiene azufre y al menos uno de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre yodo, y en la que dicho yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , o R_5 que es bien un grupo nitro, nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino; y sales solvatos, isómeros, tautómeros, metabolitos, análogos, o profármacos farmacéuticamente aceptables de éste. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, o amino.

[0013] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente alquilante antitumoral, antimetabolito antitumoral, antibiótico antitumoral, agente antitumoral obtenido de plantas, complejo de platino antitumoral, derivado de camptotecina antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa antitumoral, anticuerpo monoclonal, interferón, modificador de la respuesta biológica, agente hormonal anti-tumoral, agente viral anti-tumoral, inhibidor de la angiogénesis, agente de diferenciación, inhibidor de PI3K/mTOR/AKT, inhibidor del ciclo celular, inhibidor de la apoptosis, inhibidor de hsp 90, inhibidor de tubulina, inhibidor de la reparación del ADN, agente anti-angiogénico, inhibidor de la tirosina quinasa de receptores, inhibidor de topoisomerasa, taxano, agente dirigido a Her-2, antagonista hormonal, agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es citabina, capecitabina, valopicitabina o gemcitabina. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral se selecciona del grupo que consiste en Avastina, Sutent, Nexavar, Recentina, ABT-869, Axitinib, Irinotecán, topotecán, paclitaxel, docetaxel, lapatinib, Herceptina, lapatinib, tamoxifeno, un inhibidor de la aromatasa esteroide, un inhibidor de la aromatasa no-esteroide, Fulvestrant, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Cetuximab, Panitumumab, un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF1R), y CP-751871. En algunas realizaciones, el método comprende además cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia viral, terapia de ADN, terapia adyuvante, terapia neoadyuvante, terapia de ARN, inmunoterapia, nanoterapia o una combinación de éstas. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con irradiación gamma.

[0014] En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en estadio I, estadio II, o estadio III. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y en el que el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es deficiente en la reparación del ADN por recombinación homóloga. En algunas realizaciones, el cáncer de mama tiene alterada la función de BRCA1 o BRCA2. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, en el que: (a) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 100-5.000 mg/m² de gemcitabina; (b) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y (c) en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento tiene una duración de aproximadamente 11 a aproximadamente 30 días. En algunas realizaciones, en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 100-2.500 mg/m² de gemcitabina y

aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 500-2.000 mg/m² de gemcitabina y aproximadamente 50 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, en los días 1 y 8 del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1.000 mg/m² de gemcitabina y aproximadamente 2 AUC de carboplatino; y en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1, 2, 3, 4, 6, 8 ó 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral se administra como una inyección o infusión parenteral. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es 4-yodo-3-nitrobenzamida, que se administra oralmente, o como una inyección o infusión parenteral, o inhalación. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un taxano por inyección o infusión parenteral. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido o de fluido corporal. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor, una muestra de sangre, una muestra de plasma sanguíneo, una muestra de fluido peritoneal, un exudado o una efusión. En algunas realizaciones, el método comprende además ensayar una muestra del paciente para expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona o receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

[0015] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan por referencia en la presente memoria en la misma medida que si se indicara específicamente e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora por referencia.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0016] Las nuevas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

[0017] La FIG. 1 muestra la regulación al alza de la expresión génica de PARP1 en cánceres primarios humanos. Línea horizontal, expresión media de PARP1; caja, intervalo intercuartil; barras, desviación estándar.

[0018] La FIG. 2 muestra el efecto de 4-yodo-3-nitrobenzamida más carboplatino o gemcitabina en la progresión in vitro del ciclo celular de TNBC. La viabilidad de las células de TNBC, MDA-MB-463, se cuantifica por análisis FACS.

[0019] La FIG. 3 muestra la inhibición de PARP en células mononucleares de sangre periférica (PMBC) de pacientes que reciben 4-yodo-3-nitrobenzamida.

[0020] La FIG. 4 muestra el perfil de expresión de PARP1, ER, PR, y HER2 en muestras de tumor de mama humano en un ensayo de Fase 2 en TNBC metastásico. Los datos están normalizados respecto a la expresión génica de beta-glucuronidasa. Los datos representan el análisis de 50 muestras clínicas de cáncer de mama y 19 muestras de mama normales. La línea vertical representa la expresión génica media y la caja representa el intervalo intercuartil.

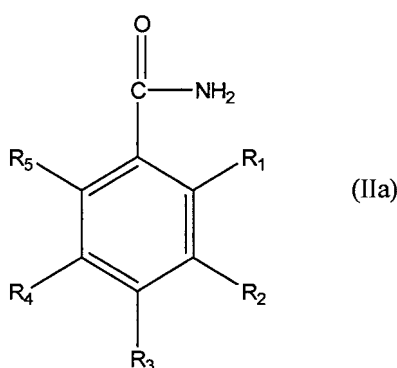
[0021] La FIG. 5 muestra la curva de Kaplan-Meier de PFS en pacientes con TNBC metastásico que reciben 4-yodo-3-nitrobenzamida más gemcitabina/carboplatino frente a gemcitabina/carboplatino solo. Las

distribuciones de PFS en los dos brazos de tratamiento se resumen usando el método de Kaplan-Meier. Los dos brazos se comparan usando un ensayo de rango logarítmico bilateral en el nivel de significancia del 5%. G/C, gemcitabina/carboplatino; G/C+BA, gemcitabina/carboplatino + 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA).

[0022] La FIG. 6 muestra que la 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) potencia la parada del ciclo celular en S y G2/M e incrementa el efecto antiproliferativo de la irradiación gamma en células de cáncer de mama humano triple negativo, MDA-MB-468.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0023] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama que es negativo para al menos uno de ER, PR, o HER2 en un paciente, que comprende administrar al paciente al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, respuesta patológica completa, o enfermedad estable. En algunas realizaciones, se obtiene una tasa de beneficio clínico comparable ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ meses) con el tratamiento con el inhibidor de PARP comparado con el tratamiento con un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 30%. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es un inhibidor de PARP-1. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP tiene la Fórmula (IIa) o un metabolito de éste:



Fórmula (IIa)

en la que bien: (1) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre un sustituyente que contiene azufre, y los sustituyentes restantes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, amino, nitro, yodo, bromo, flúor, cloro, alquilo (C_1 - C_6), alcoxi (C_1 - C_6), cicloalquilo (C_3 - C_7), y fenilo, en la que al menos dos de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 son siempre hidrógeno; o (2) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 no es un sustituyente que contiene azufre y al menos uno de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre yodo, y en la que dicho yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , o R_5 que es bien un grupo nitro, nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino; y sales solvatos, isómeros, tautómeros, metabolitos, análogos, o profármacos farmacéuticamente aceptables de éste. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, o amino. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP 1 es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta.

[0024] En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en estadio I, II o III. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o

HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y tanto HER2-positivo como PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y ER-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y tanto ER-positivo como HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y ER-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y tanto ER-positivo como PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, HER2-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo, HER2-negativo y ER-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es deficiente en la reparación del ADN por recombinación homóloga.

[0025] En algunas realizaciones, el tratamiento comprende un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, en el que en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente, como una inyección o infusión parenteral, o inhalación. En algunas realizaciones, el ciclo de tratamiento tiene una duración de aproximadamente 11 a aproximadamente 30 días.

[0026] En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con al menos un agente anti-tumoral. El agente anti-tumoral es un agente alquilante antitumoral, antimetabolito antitumoral, antibióticos antitumorales, agente antitumoral obtenido de plantas, compuesto organoplatino antitumoral, derivado de camptotecina antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa antitumoral, anticuerpo monoclonal, interferón, modificador de la respuesta biológica, agente hormonal anti-tumoral, agente viral anti-tumoral, inhibidor de la angiogénesis, agente de diferenciación, u otro agente que presente actividades anti-tumorales, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es citabina, capecitabina, valopicitabina o gemcitabina. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un complejo de platino. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con más de un agente anti-tumoral. El agente anti-tumoral se administra antes de, junto con o posteriormente a la administración del inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con un agente anti-angiogénico tal como Avastina. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con un inhibidor de topoisomerasa, tal como irinotecán o topotecán. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con un taxano, tal como paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con un agente dirigido a Her-2, tal como Herceptina. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con terapia hormonal, tal como el antagonista hormonal tamoxifeno. En algunas realizaciones, el método comprende además

administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con un agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento, incluyendo un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1) (IGF1R). En algunas realizaciones, el método comprende además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con irradiación gamma. En algunas realizaciones, el método comprende además cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia adyuvante, terapia neoadyuvante, terapia de ARN, terapia de ADN, terapia viral, inmunoterapia, nanoterapia o una combinación de éstas.

[0027] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende administrar al paciente al menos un inhibidor de PARP y al menos un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, respuesta patológica completa, o enfermedad estable. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ meses) comparada con el tratamiento con el antimetabolito y complejo de platino pero sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el complejo de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaplatino y oxaliplatino. En algunas realizaciones, el complejo de platino es carboplatino. En algunas realizaciones, el antimetabolito es una citabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito se selecciona del grupo que consiste en citabina, capecitabina, gemcitabina y valopicitabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito es gemcitabina. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un taxano al paciente. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en estadio I, II o III. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y tanto HER2-positivo como PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y ER-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y tanto ER-positivo como HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y ER-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y tanto ER-positivo como PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, HER2-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo, HER2-negativo y ER-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-

negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es deficiente en la reparación del ADN por recombinación homóloga.

[0028] En algunas realizaciones, los métodos comprenden además administrar un inhibidor de PARP en combinación con un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente alquilante antitumoral, antimetabolito antitumoral, antibiótico antitumoral, agente antitumoral obtenido de plantas, complejo de platino antitumoral, derivado de camptotecina antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa antitumoral, anticuerpo monoclonal, interferón, modificador de la respuesta biológica, agente hormonal antitumoral, inhibidor de la angiogénesis, agente de diferenciación, u otro agente que presente actividades anti-tumorales, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos. En algunas realizaciones, el complejo de platino es cisplatino, carboplatino, oxaplatino u oxaliplatino. En algunas realizaciones, el antimetabolito es citabina, capecitabina, gemcitabina o valopicitabina. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además administrar al paciente un inhibidor de PARP en combinación con más de un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral se administra antes de, junto con o posteriormente a la administración del inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente anti-angiogénico, tal como Avastina. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un inhibidor de topoisomerasa incluyendo pero no limitado a irinotecán, topotecán, o camptotecina. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un taxano incluyendo pero no limitado a paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente dirigido a Her-2, p. ej. Herceptina. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un antagonista hormonal, por ejemplo tamoxifeno. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente dirigido a un receptor de factor de crecimiento. En algunas realizaciones, dicho agente es un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o un inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1) (IGF1R). En otras realizaciones, el método comprende además cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia adyuvante, terapia neoadyuvante, terapia viral, terapia de ARN, inmunoterapia, nanoterapia o una combinación de éstas.

[0029] En algunas realizaciones, el tratamiento comprende un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, en el que en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, en el que en los días 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, en el que en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, ó 10, 12, 14, 16, 18, ó 20 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida.

[0030] En algunas realizaciones, el tratamiento comprende un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, en el que: (a) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 100-2.000 mg/m² de gemcitabina; (b) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y (c) en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 100-2.500 mg/m² de gemcitabina y aproximadamente 1-5 AUC de carboplatino (aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino); y en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 500-2.000 mg/m² de gemcitabina y aproximadamente 50 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y en los días 1, 4, 8 y 11

del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, en los días 1 y 8 del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1.000 mg/m² de gemcitabina y aproximadamente 2 AUC de carboplatino; y en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo el paciente recibe aproximadamente 1, 2, 3, 4, 6, 8 ó 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida.

[0031] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que tiene cáncer de mama triple negativo, que comprende durante un ciclo de tratamiento de 21 días, en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 10 a aproximadamente

100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0032] Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que tiene cáncer de mama triple negativo, que comprende durante un ciclo de tratamiento de 21 días: (a) en los días 1 y 8 del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 100-2.000 mg/m² de gemcitabina; (b) en los días 1 y 8 del ciclo, administrar al paciente 0,1-10 AUC de carboplatino (aproximadamente 10 a 400 mg/m² de carboplatino); y (c) en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la gemcitabina se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la gemcitabina se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0033] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que tiene cáncer de mama triple negativo, que comprende: (a) establecer un ciclo de tratamiento de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 días de duración; (b) en de 1 a 10 días separados del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida, o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0034] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que tiene cáncer de mama triple negativo, que comprende: (a) establecer un ciclo de tratamiento de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 días de duración; (b) en de 1 a 5 días separados del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 100 a aproximadamente 5.000 mg/m² de gemcitabina por infusión intravenosa; (c) en de 1 a 5 días separados del ciclo, administrar al paciente 1 AUC a 10 AUC de carboplatino por infusión intravenosa (p. ej. aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino); y (d) en de 1 a 10 días separados del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida, o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la gemcitabina se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0035] Algunas realizaciones incluyen un método para tratar cáncer de mama en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar al menos uno de los siguientes: (i) si el cáncer es ER-positivo o ER-negativo; (ii) si el cáncer es

PR-positivo o PR-negativo; (iii) si el cáncer es HER2-positivo o HER2-negativo; (c) si el ensayo indica que el cáncer es ER-negativo, PR-negativo o HER2-negativo, tratar al paciente con una combinación de agentes terapéuticos, en el que los agentes terapéuticos incluyen al menos un antimetabolito, al menos un complejo de platino y al menos un inhibidor de PARP; y (d) si el ensayo no indica que el cáncer es ER-negativo, PR-negativo o HER2-negativo, seleccionar una opción de tratamiento diferente.

[0036] Algunas realizaciones incluyen un método para tratar cáncer de mama en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar al menos uno de los siguientes: (i) si el cáncer es ER-positivo o ER-negativo; (ii) si el cáncer es PR-positivo o PR-negativo; (iii) si el cáncer es HER2-positivo o HER2-negativo; (c) si el ensayo indica que el cáncer es ER-negativo, PR-negativo o HER2-negativo, tratar al paciente con al menos un inhibidor de PARP; y (d) si el ensayo no indica que el cáncer es ER-negativo, PR-negativo o HER2-negativo, seleccionar una opción de tratamiento diferente.

[0037] En algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, respuesta patológica completa, o enfermedad estable. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico ($\text{CBR} = \text{CR} + \text{PR} + \text{SD} \geq 6$ meses) comparada con el tratamiento sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 30%. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico ($\text{CBR} = \text{CR} + \text{PR} + \text{SD} \geq 6$ meses) comparada con el tratamiento con el antimetabolito y el complejo de platino pero sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es un inhibidor de PARP-1. En otras realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el complejo de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaplatino y oxaliplatino. En algunas realizaciones, el complejo de platino es carboplatino. En algunas realizaciones, el antimetabolito es una citabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito se selecciona del grupo que consiste en citabina, capecitabina, gemcitabina y valopicitabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito es gemcitabina. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un taxano al paciente. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido o de fluido corporal. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor, una muestra de sangre, una muestra de plasma sanguíneo, una muestra de fluido peritoneal, un exudado o una efusión. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en estadio I, II o III. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y tanto PR-positivo como HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y ER-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y tanto ER-positivo como HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y ER-positivo. En algunas

realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es HER2-negativo y tanto ER-positivo como PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, HER2-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo, HER2-negativo y PR-positivo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo.

[0038] Algunas realizaciones de la invención proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar cada uno de lo siguiente: (i) si el cáncer es ER-positivo o -negativo; (ii) si el cáncer es PR-positivo o -negativo; (iii) si el cáncer es HER2-positivo o -negativo; (c) si se cumplen dos o más de las condiciones siguientes, tratar al paciente con al menos un inhibidor de PARP: (i) el cáncer es ER-negativo, (ii) el cáncer es PR-negativo, o (iii) el cáncer es HER2-negativo; y (d) si no se cumplen al menos dos de las condiciones anteriores, seleccionar una opción de tratamiento diferente. Algunas realizaciones de la invención proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar cada uno de lo siguiente: (i) si el cáncer es ER-positivo o -negativo; (ii) si el cáncer es PR-positivo o -negativo; (iii) si el cáncer es HER2-positivo o -negativo; (c) si se cumplen dos o más de las condiciones siguientes, tratar al paciente con una combinación de agentes terapéuticos, en el que los agentes terapéuticos incluyen al menos un antimetabolito, al menos un complejo de platino y al menos un inhibidor de PARP: (i) el cáncer es ER-negativo, (ii) el cáncer es PR-negativo, o (iii) el cáncer es HER2-negativo; y (d) si no se cumplen al menos dos de las condiciones anteriores, seleccionar una opción de tratamiento diferente. En algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, respuesta patológica completa, o enfermedad estable. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ meses) comparada con el tratamiento sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 30%. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ meses) comparada con el tratamiento con el antimetabolito y el complejo de platino pero sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido o de fluido corporal. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor, una muestra de sangre, una muestra de plasma sanguíneo, una muestra de fluido peritoneal, un exudado o una efusión. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es un inhibidor de PARP-1. En otras realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el complejo de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaplatino y oxaliplatino. En algunas realizaciones, el complejo de platino es carboplatino. En algunas realizaciones, el antimetabolito es una citabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito se selecciona del grupo que consiste en citabina, capecitabina, gemcitabina y valopicitabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito es gemcitabina. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un taxano al paciente. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en estadio I, II o III. En

algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende seleccionar un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, y: (a) en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende seleccionar un ciclo de tratamiento de al menos 11 días, y: (a) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 100-2.000 mg/m² de gemcitabina; (b) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y (c) en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la gemcitabina se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0039] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar cada uno de lo siguiente: (i) si el cáncer es ER-positivo o -negativo; (ii) si el cáncer es PR-positivo o -negativo; y (iii) si el cáncer es HER2-positivo o -negativo; (c) si se cumplen dos o más de las condiciones siguientes, tratar al paciente con al menos un inhibidor de PARP: (i) el cáncer es ER-negativo, (ii) el cáncer es PR-negativo, o (iii) el cáncer es HER2-negativo; y (d) si no se cumplen dos o más de las condiciones (i)-(iii), seleccionar una opción de tratamiento diferente.

[0040] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama metastásico ER-negativo, PR-negativo, HER-2 negativo en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico (CBR = CR + PR + SD $\geq$ 6 meses) comparada con sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 30%. En algunas realizaciones, dos o más de los compuestos terapéuticos se administran al paciente en una forma de dosificación única. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es un inhibidor de PARP-1. En otras realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende seleccionar un ciclo de tratamiento de al menos 11 días y

en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0041] Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende: (a) ensayar una muestra del paciente para la expresión de PARP; y (b) si la expresión de PARP supera un nivel predeterminado, administrar al paciente al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, respuesta patológica completa, o enfermedad estable. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico ($CBR = CR + PR + SD \geq 6$ meses) comparada con el tratamiento sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 30%. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es un inhibidor de PARP-1. En otras realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico.

[0042] En algunas realizaciones, el método comprende además ensayar una muestra del paciente para expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona o receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende seleccionar un ciclo de tratamiento de al menos 11 días y en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0043] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar cada uno de lo siguiente: (i) si el cáncer es ER-positivo o -negativo; (ii) si el cáncer es PR-positivo o -negativo; y (iii) si el cáncer es HER2-positivo o -negativo; (c) si se cumplen dos o más de las condiciones siguientes, tratar al paciente con una combinación de agentes terapéuticos, en el que los agentes terapéuticos incluyen al menos un antimetabolito, al menos un complejo de platino y al menos un inhibidor de PARP: (i) el cáncer es ER-negativo, (ii) el cáncer es PR-negativo, o (iii) el cáncer es HER2-negativo; y (d) si no se cumplen dos o más de las condiciones (i)-(iii), seleccionar una opción de tratamiento diferente. En algunas realizaciones, la gemcitabina se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0044] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama metastásico ER-negativo, PR-negativo, HER-2 negativo en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente al menos un antimetabolito, al menos un complejo de platino y al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico

(CBR = CR + PR + SD $\geq$ 6 meses) comparada con el tratamiento con el antimetabolito y el complejo de platino pero sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, dos o más de los compuestos terapéuticos se administran al paciente en una forma de dosificación única. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el complejo de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaplatino y oxaliplatino. En algunas realizaciones, el complejo de platino es carboplatino. En algunas realizaciones, el antimetabolito es una citabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito se selecciona del grupo que consiste en citabina, capecitabina, gemcitabina y valopicitabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito es gemcitabina. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un taxano al paciente. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama está en estadio I, II o III. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende seleccionar un ciclo de tratamiento de al menos 11 días y: (a) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 100-

2.000 mg/m² de gemcitabina; (b) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y (c) en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la gemcitabina se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0045] Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende: (a) ensayar una muestra del paciente para la expresión de PARP; y (b) si la expresión de PARP supera un nivel predeterminado, administrar al paciente al menos un antimetabolito, al menos un complejo de platino y al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, respuesta patológica completa, o enfermedad estable. En algunas realizaciones, se obtiene una mejora de la tasa de beneficio clínico (CBR = CR + PR + SD $\geq$ 6 meses) comparada con el tratamiento con el antimetabolito y el complejo de platino pero sin el inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, la mejora de la tasa de beneficio clínico es al menos aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el complejo de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaplatino y oxaliplatino. En algunas realizaciones, el complejo de platino es carboplatino. En algunas realizaciones, el antimetabolito es una citabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito se selecciona del grupo que

consiste en citabina, capecitabina, gemcitabina y valopicitabina. En algunas realizaciones, el antimetabolito es gemcitabina. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar un taxano al paciente. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico. En algunas realizaciones, el método comprende además ensayar una muestra del paciente para expresión del receptor de estrógeno, receptor de progesterona o receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de: ER, PR o HER2; y el cáncer de mama es positivo para al menos uno de ER, PR o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama ER-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y PR-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende seleccionar un ciclo de tratamiento de al menos 11 días y: (a) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 100-2.000 mg/m² de gemcitabina; (b) en los días 1 y 8 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m² de carboplatino; y (c) en los días 1, 4, 8 y 11 del ciclo, el paciente recibe aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la gemcitabina se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0046] Así, las realizaciones proporcionadas en la presente memoria comprenden tratar a un paciente con al menos tres sustancias químicamente distintas, una de las cuales es un antimetabolito, una de las cuales es un complejo que contiene platino y una de las cuales es un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, una o más de estas sustancias puede estar presente en varias formas físicas—p. ej. base libre, sales (especialmente sales farmacéuticamente aceptables), hidratos, polimorfos, solvatos, metabolitos, etc. A no ser que se cualifique de otra forma en la presente memoria, se pretende que el uso de un nombre químico englobe todas las formas físicas del compuesto químico nombrado. Por ejemplo, el recitado de 4-yodo-3-nitrobenzamida, sin más cualificación, se pretende que englobe genéricamente la base libre así como todas las sales farmacéuticamente aceptables, polimorfos, hidratos, metabolitos, etc. Cuando se pretende que la descripción o reivindicaciones se limiten a una forma física particular de un compuesto, esto resultará evidente a partir del contexto del pasaje o reivindicación en la que aparece la referencia al compuesto.

[0047] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para tratar cáncer de mama, que comprende administrar al paciente al menos un taxano, al menos un complejo de platino y al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, se obtiene al menos un efecto terapéutico, siendo dicho al menos un efecto terapéutico la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, respuesta patológica completa, o enfermedad estable. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la benzamida es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el complejo de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaplatino y oxaliplatino. En algunas realizaciones, el complejo de platino es carboplatino. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel o docetaxel. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel. En algunas realizaciones, el método comprende,

durante un ciclo de tratamiento de al menos 11 días: (a) en el día 1 del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 10-200 mg/m² de paclitaxel; (b) en el día 1 del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 10-400 mg/m² de carboplatino; y (c) en el día 1 y dos veces a la semana a lo largo del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 1-100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida o un equivalente molar de un metabolito de ésta.

[0048] En algunas realizaciones, la descripción de la presente memoria proporciona un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende: (a) obtener una muestra del paciente; (b) ensayar la muestra para determinar un nivel de expresión de PARP en la muestra; (c) determinar si la expresión de PARP supera un nivel predeterminado, y si lo hace, administrar al paciente al menos un taxano, al menos un complejo de platino y al menos un inhibidor de PARP. En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar opcionalmente una opción de tratamiento diferente si la expresión de PARP en la muestra no supera el nivel predeterminado. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama que es negativo para uno o más receptores hormonales. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama que es negativo para HER2. En algunas realizaciones, el cáncer es negativo para el receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) o HER2. En algunas realizaciones, el cáncer es positivo para al menos un receptor hormonal o HER2. En algunas realizaciones, el taxano es cisplatino, carboplatino, oxaplatino u oxaliplatino. En algunas realizaciones, el taxano es paclitaxel. En algunas realizaciones, el complejo de platino es cisplatino o carboplatino. En algunas realizaciones, el complejo de platino es carboplatino. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es una benzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, el inhibidor de PARP es 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito de ésta. En algunas realizaciones, la muestra es una sección de tumor o un fluido corporal.

[0049] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende durante un ciclo de tratamiento de 21 días: (a) en el día 1 del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 750 mg/m² de paclitaxel; (b) en el día 1 del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 10-400 mg/m² de carboplatino; y (c) en el día 1 del ciclo, y dos veces a la semana posteriormente, administrar al paciente aproximadamente 1-100 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida. En algunas realizaciones, el paclitaxel se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, el carboplatino se administra como una infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la 4-yodo-3-nitrobenzamida se administra oralmente o como una infusión intravenosa.

[0050] Algunas realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan un método para tratar cáncer de mama en un paciente, que comprende: (a) establecer un ciclo de tratamiento de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 días de duración; (b) en de 1 a 5 días separados del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 mg/m² de paclitaxel por infusión intravenosa durante aproximadamente 10 a aproximadamente 300 minutos; (c) en de 1 a 5 días separados del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 10-400 mg/m² de carboplatino por infusión intravenosa durante aproximadamente 10 a aproximadamente 300 minutos; y (d) en de 1 a 10 días separados del ciclo, administrar al paciente aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg de 4-yodo-3-nitrobenzamida durante aproximadamente 10 a aproximadamente 300 minutos.

[0051] Así, las realizaciones proporcionadas en la presente memoria comprenden tratar a un paciente con al menos tres sustancias químicamente distintas, una de las cuales es un taxano (p. ej. paclitaxel o docetaxel), una de las cuales es un complejo que contiene platino (p. ej. cisplatino o carboplatino o cisplatino) y una de las cuales es un inhibidor de PARP (p. ej. BA o un metabolito de ésta). En algunas realizaciones, una o más de estas sustancias puede estar presente en varias formas físicas—p. ej. base libre, sales (especialmente sales

farmacéuticamente aceptables), hidratos, polimorfos, solvatos, metabolitos, etc. A no ser que se cualifique de otra forma en la presente memoria, se pretende que el uso de un nombre químico englobe todas las formas físicas del compuesto químico nombrado. Por ejemplo, el recitado de 4-yodo-3-nitrobenzamida, sin más cualificación, se pretende que englobe genéricamente la base libre así como todas las sales, polimorfos, hidratos, y metabolitos farmacéuticamente aceptables de ésta. Cuando se pretende que la descripción o reivindicaciones se limiten a una forma física particular de un compuesto, esto será evidente a partir del contexto del pasaje o reivindicación en la que aparece la referencia al compuesto.

[0052] Los términos “cantidad eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” se refieren a una cantidad suficiente del agente para proporcionar el resultado biológico, terapéutico, y/o profiláctico deseado. Este resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una “cantidad eficaz” para usos terapéuticos es la cantidad de un compuesto nitrobenzamida como se describe en la presente memoria per se o una composición que comprende el compuesto nitrobenzamida de la presente memoria requerida para proporcionar una disminución clínicamente significativa en una enfermedad. Una cantidad eficaz apropiada en cualquier caso individual puede determinarla el experto en la técnica usando experimentación rutinaria.

[0053] Por “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se quiere decir un material que no es biológicamente o de otra forma indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables significativos o sin interaccionar de una manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

[0054] El término “tratamiento” y sus equivalentes gramaticales, como se usan en la presente memoria incluyen conseguir un efecto terapéutico y/o profiláctico beneficioso. Por efecto terapéutico beneficioso se entiende la erradicación o mejoría del trastorno subyacente a tratar. Por ejemplo, en un paciente con cáncer, el beneficio terapéutico incluye la erradicación o mejoría del cáncer subyacente. Además, se consigue un beneficio terapéutico con la erradicación o mejoría de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de tal forma que se observa una mejoría en el paciente, independientemente del hecho de que el paciente pueda seguir padeciendo el trastorno subyacente. Para un beneficio profiláctico, puede realizarse un método de la invención, o puede administrarse una composición de la invención a un paciente con riesgo de desarrollar cáncer, o a un paciente que notifica uno o más de los síntomas fisiológicos de dichas condiciones, aunque no se haya realizado el diagnóstico de la condición.

Agentes anti-tumorales

[0055] Los agentes anti-tumorales que pueden usarse en la presente invención incluyen pero no están limitados a agentes alquilantes antitumorales, antimetabolitos antitumorales, antibióticos antitumorales, agentes antitumorales obtenidos de plantas, complejo de platino antitumoral, derivados de camptotecina antitumorales, inhibidores de tirosina quinasa antitumorales, anticuerpos monoclonales, interferones, modificadores de la respuesta biológica, y otros agentes que presentan actividades anti-tumorales, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos.

[0056] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente alquilante. El término "agente alquilante" en la presente memoria se refiere generalmente a un agente que proporciona un grupo alquilo en la reacción de alquilación en la que un átomo de hidrógeno de un compuesto orgánico se sustituye con un grupo alquilo. Los ejemplos de agentes alquilantes anti-tumorales incluyen pero no están limitados a N-óxido de la mostaza de nitrógeno, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, busulfán, mitobronitol, carbocuenta, tiotepa, ranimustina, nimustina, temozolomida o carmustina.

[0057] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un antimetabolito. El término "antimetabolito" usado en la presente memoria incluye, en un sentido amplio, sustancias que alteran el metabolismo normal y sustancias que inhiben el sistema de transferencia de electrones para evitar la producción de intermedios ricos en energía, debido a sus similitudes estructurales o funcionales con metabolitos que son importantes para los organismos vivos (tales como vitaminas, coenzimas, aminoácidos y sacáridos). Los ejemplos de antimetabolitos que tienen actividades anti-tumorales incluyen pero no están limitados a metotrexato, 6-mercaptopurina ribósido, mercaptopurina, 5-fluorouracilo, tegafur, doxifluridina, carmofur, citarabina, ocfosfato de citarabina, enocitabina, S-1, gemcitabina, fludarabina o pemetrexed disodio, y se prefieren 5-fluorouracilo, S-1, gemcitabina y semejantes.

[0058] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un antibiótico antitumoral. Los ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen pero no están limitados a actinomicina D, doxorubicina, daunorubicina, neocarzinostatina, bleomicina, peplomycin, mitomicina C, aclarubicina, pirarubicina, epirubicina, zinostatina estimalamer, idarubicina, sirolimus o valrubicina.

En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente antitumoral obtenido de plantas. Los ejemplos de agentes antitumorales obtenidos de plantas incluyen pero no están limitados a vincristina, vinblastina, vindesina, etopósido, sobuzoxano, docetaxel, paclitaxel y vinorelbina, y se prefieren docetaxel y paclitaxel.

[0059] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un derivado de camptotecina que presenta actividades anti-tumorales. Los ejemplos de derivados de camptotecina anti-tumorales incluyen pero no están limitados a camptotecina, 10-hidroxycamptotecina, topotecán, irinotecán ó 9-aminocamptotecina, prefiriéndose camptotecina, topotecán e irinotecán. Además, irinotecán se metaboliza in vivo y presenta efecto antitumoral como SN-38. Se cree que el mecanismo de acción y la actividad de los derivados de camptotecina son virtualmente los mismos que los de la camptotecina (p. ej., Nitta, et al., Gan to Kagaku Ryoho, 14, 850-857 (1987)).

[0060] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un compuesto organoplatino o un compuesto de coordinación de platino que tiene actividad antitumoral. El compuesto organoplatino en la presente memoria se refiere a un compuesto que contiene platino que proporciona platino en forma de ión. Los compuestos organoplatino preferidos incluyen pero no están limitados a cisplatino; cis-diaminadiacuoplatino (II)-ión; cloruro de cloro(dietilentriamina)-platino (II); dicloro(etilendiamina)-platino (II); diamina(1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino (II) (carboplatino); espiroplatino; iroplatino; diamina(2-etilmalonato)platino (II); etilendiaminamalonatoplatino (II); acua(1,2-diaminodiciclohexano)sulfatoplatino (II); acua(1,2-diaminodiciclohexano)malonatoplatino (II); (1,2-diaminodiciclohexano)malonatoplatino (II); (4-carboxiftalato)(1,2-diaminodiciclohexano) platino (II); (1,2-diaminodiciclohexano)-(isocitrato)platino (II); (1,2-diaminodiciclohexano)oxalatoplatino (II); ormaplatino; tetraplatino; carboplatino, nedaplatino y oxaliplatino, y se prefieren carboplatino u oxaliplatino. Además, otros compuestos organoplatino antitumorales mencionados en la especificación son conocidos y están disponibles comercialmente y/o se pueden producir por un experto en la técnica por técnicas convencionales.

[0061] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un inhibidor de tirosina quinasa antitumoral. El término "inhibidor de tirosina quinasa" en la presente memoria se refiere a un sustancia química que inhibe "tirosina quinasa" que transfiere un grupo λ -fosfato del ATP a un grupo hidroxilo de una tirosina específica de una proteína. Los ejemplos de inhibidores de tirosina quinasa anti-tumorales incluyen pero no están limitados a gefitinib, imatinib, erlotinib, Sutent, Nexavar, Recentina, ABT-869, y Axitinib.

[0062] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un anticuerpo o una parte de unión de un anticuerpo que presenta actividad anti-tumoral. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un

anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de éstos incluyen pero no están limitados a abciximab, adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, bevacizumab, cetuximab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, ibritumomab, tiuxetán, infliximab, muromonab-CD3, natalizumab, omalizumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, gemtuzumab ozogamicina, rituximab, tositumomab, trastuzumab, o cualquier fragmento de anticuerpo específico de antígeno.

[0063] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un interferón. Dicho interferón tiene actividad antitumoral, y es una glicoproteína que es producida y secretada por la mayoría de las células animales después de una infección viral. No tiene sólo el efecto de inhibir el crecimiento viral sino también varios mecanismos efectores inmunes incluyendo la inhibición del crecimiento de células (en particular, células tumorales) y el incremento de la actividad de las células asesinas naturales, designándose así como un tipo de citoquina. Los ejemplos de interferones anti-tumorales incluyen pero no están limitados a interferón α , interferón α -2a, interferón α -2b, interferón β , interferón γ -1a e interferón γ -n1.

[0064] En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un modificador de la respuesta biológica. Generalmente es el término genérico para sustancias o fármacos que modifican los mecanismos de defensa de los organismos vivos o respuestas biológicas tales como supervivencia, crecimiento o diferenciación de células de tejidos con el fin de dirigirlos para que sean útiles para un individuo frente a un tumor, infección u otras enfermedades. Los ejemplos de modificador de la respuesta biológica incluyen pero no están limitados a krestina, lentinano, sizofirano, picibanil y ubenimex.

[0065] En algunas realizaciones, los agentes anti-tumorales incluyen pero no están limitados a mitoxantrona, L-asparaginasa, procarbazona, dacarbazina, hidroxycarbamida, pentostatina, tretinoína, alefacept, darbepoetina alfa, anastrozol, exemestano, bicalutamida, leuprorelina, flutamida, fulvestrant, pegaptanib octasodio, denileukina difitox, aldesleukina, tiotropina alfa, trióxido arsénico, bortezomib, capecitabina, y goserelina.

[0066] Los términos descritos anteriormente "agente alquilante antitumoral", "antimetabolito antitumoral", "antibiótico antitumoral", "agente antitumoral obtenido de plantas", "compuesto de coordinación de platino antitumoral", "derivado de camptotecina antitumoral", "inhibidor de tirosina quinasa antitumoral", "anticuerpo monoclonal", "interferón", "modificador de la respuesta biológica" y "otro agente antitumoral" son todos conocidos y están disponibles comercialmente o pueden ser producidos por un experto en la técnica por métodos conocidos per se o por métodos muy conocidos o convencionales. El proceso para la preparación de gefitinib se describe, por ejemplo, en la Pat. de EEUU No. 5.770.599; el proceso para la preparación de cetuximab se describe, por ejemplo, en WO 96/40210; el proceso para la preparación de bevacizumab se describe, por ejemplo, en WO 94/10202; el proceso para la preparación de oxaliplatino se describe, por ejemplo, en las Pat. de EEUU Nos. 5.420.319 y 5.959.133; el proceso para la preparación de gemcitabina se describe, por ejemplo, en las Pat. de EEUU Nos. 5.434.254 y 5.223.608; y el proceso para la preparación de camptotecina se describe en las Pat. de EEUU Nos. 5.162.532, 5.247.089, 5.191.082, 5.200.524, 5.243.050 y 5.321.140; el proceso para la preparación de irinotecán se describe, por ejemplo, en la Pat. de EEUU No. 4.604.463; el proceso para la preparación de topotecán se describe, por ejemplo, en la Pat. de EEUU No. 5.734.056; el proceso para la preparación de temozolomida se describe, por ejemplo, en JP-B No. 4-5029; y el proceso para la preparación de rituximab se describe, por ejemplo, en JP-W No. 2-503143.

[0067] Los agentes alquilantes antitumorales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: N-óxido de mostaza de nitrógeno de Mitsubishi Pharma Corp. como Nitrorin (nombre comercial); ciclofosfamida de Shionogi & Co., Ltd. como Endoxan (nombre comercial); ifosfamida de Shionogi & Co., Ltd. como Ifomida (nombre comercial); melfalán de GlaxoSmithKline Corp. como Alkeran (nombre comercial); busulfán de Takeda Pharmaceutical Co., Ltd. como Mablin (nombre

comercial); mitobronitol de Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd. como Myebrol (nombre comercial); carbocuna de Sankyo Co., Ltd. como Esquinon (nombre comercial); tiotepa de Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd. como Tespamin (nombre comercial); ranimustina de Mitsubishi Pharma Corp. como Cymerin (nombre comercial); nimustina de Sankyo Co., Ltd. como Nidran (nombre comercial); temozolomida de Schering Corp. como Temodar (nombre comercial); y carmustina de Guilford Pharmaceuticals Inc. como Gliadel Wafer (nombre comercial).

[0068] Los antimetabolitos antitumorales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: metotrexato de Takeda Pharmaceutical Co., Ltd. como Methotrexate (nombre comercial); 6-mercaptopurina ribósido de Aventis Corp. como Thioinosine (nombre comercial); mercaptopurina de Takeda Pharmaceutical Co., Ltd. como Leukerin (nombre comercial); 5-fluorouracilo de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. como 5-FU (nombre comercial); tegafur de Taiho Pharmaceutical Co., Ltd. como Futraful (nombre comercial); doxifluridina de Nippon Roche Co., Ltd. como Furutulon (nombre comercial); carmofur de Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd. como Yamafur (nombre comercial); citarabina de Nippon Shinyaku Co., Ltd. como Cylocide (nombre comercial); ocfosfato de citarabina de Nippon Kayaku Co., Ltd. como Strasid (nombre comercial); enocitabina de Asahi Kasei Corp. como Sanrabin (nombre comercial); S-1 de Taiho Pharmaceutical Co., Ltd. como TS-1 (nombre comercial); gemcitabina de Eli Lilly & Co. como Gemzar (nombre comercial); fludarabina de Nippon Schering Co., Ltd. como Fludara (nombre comercial); y pemetrexed disodio de Eli Lilly & Co. como Alimta (nombre comercial).

Los antibióticos antitumorales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: actinomicina D de Banyu Pharmaceutical Co., Ltd. como Cosmegen (nombre comercial); doxorubicina de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. como adriacin (nombre comercial); daunorubicina de Meiji Seika Kaisha Ltd. como Daunomycin; neocarzinostatina de Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd. como Neocarzinostatin (nombre comercial); bleomicina de Nippon Kayaku Co., Ltd. como Bleo (nombre comercial); pepromicina de Nippon Kayaku Co., Ltd. como Pepro (nombre comercial); mitomicina C de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. como Mitomycin (nombre comercial); aclarubicina de Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd. como Aclacinon (nombre comercial); pirarubicina de Nippon Kayaku Co., Ltd. como Pinorubicin (nombre comercial); epirubicina de Pharmacia Corp. como Pharmorubicin (nombre comercial); zinostatina stimalamer de Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd. como Smancs (nombre comercial); idarubicina de Pharmacia Corp. como Idamycin (nombre comercial); sirolimus de Wyeth Corp. como Rapamune (nombre comercial); y valrubicina de Anthra Pharmaceuticals Inc. como Valstar (nombre comercial).

[0069] Los agentes antitumorales obtenidos de plantas mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: vincristina de Shionogi & Co., Ltd. como Oncovin (nombre comercial); vinblastina de Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd. como Vinblastine (nombre comercial); vindesina de Shionogi & Co., Ltd. como Fildesin (nombre comercial); etopósido de Nippon Kayaku Co., Ltd. como Lastet (nombre comercial); sobuzoxano de Zenyaku Kogyo Co., Ltd. como Perazolin (nombre comercial); docetaxel de Aventis Corp. como Taxsotere (nombre comercial); paclitaxel de Bristol-Myers Squibb Co. como Taxol (nombre comercial); y vinorelbina de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. como Navelbine (nombre comercial).

[0070] Los compuestos de coordinación de platino antitumorales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: cisplatino de Nippon Kayaku Co., Ltd. como Randa (nombre comercial); carboplatino de Bristol-Myers Squibb Co. como Paraplatin (nombre

comercial); nedaplatino de Shionogi & Co., Ltd. como Aqupla (nombre comercial); y oxaliplatino de Sanofi-Synthelabo Co. como Eloxatin (nombre comercial).

[0071] Los derivados de camptotecina antitumorales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: irinotecán de Yakult Honsha Co., Ltd. como Campto (nombre comercial); topotecán de GlaxoSmithKline Corp. como Hycamtin (nombre comercial); y camptotecina de Aldrich Chemical Co., Inc., EEUU.

Los inhibidores de tirosina quinasa antitumorales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: gefitinib de AstraZeneca Corp. como Iressa (nombre comercial); imatinib de Novartis AG como Gleevec (nombre comercial); y erlotinib de OSI Pharmaceuticals Inc. como Tarceva (nombre comercial).

[0072] Los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: cetuximab de Bristol-Myers Squibb Co. como Erbitux (nombre comercial); bevacizumab de Genentech, Inc. como Avastin (nombre comercial); rituximab de Biogen Idec Inc. como Rituxan (nombre comercial); alemtuzumab de Berlex Inc. como Campath (nombre comercial); y trastuzumab de Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. como Herceptin (nombre comercial).

[0073] Los interferones mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: interferón α de Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd. como Sumiferon (nombre comercial); interferón α -2a de Takeda Pharmaceutical Co., Ltd. como Canferon-A (nombre comercial); interferón α -2b de Schering-Plough Corp. como Intron A (nombre comercial); interferón β de Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. como IFN.beta. (nombre comercial); interferón γ -1a de Shionogi & Co., Ltd. como Imunomax- γ (nombre comercial); e interferón γ -n1 de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. como Ogamma (nombre comercial).

Los modificadores de la respuesta biológica mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: krestina de Sankyo Co., Ltd. como krestin (nombre comercial); lentinano de Aventis Corp. como Lentinan (nombre comercial); sizofirano de Kaken Seiyaku Co., Ltd. como Sonifiran (nombre comercial); picibanil de Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. como Picibanil (nombre comercial); y ubenimex de Nippon Kayaku Co., Ltd. como Bestatin (nombre comercial).

[0074] Los demás agentes antitumorales mencionados anteriormente están disponibles comercialmente, como se ejemplifica por lo siguiente: mitoxantrona de Wyeth Lederle Japan, Ltd. como Novantrone (nombre comercial); L-asparaginasa de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. como Leunase (nombre comercial); procarbazona de Nippon Roche Co., Ltd. como Natulan (nombre comercial); dacarbazina de Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. como Dacarbazine (nombre comercial); hidroxycarbamida de Bristol-Myers Squibb Co. como Hydrea (nombre comercial); pentostatina de Kagaku Oyobi Kessei Ryoho Kenkyusho como Coforin (nombre comercial); tretinoína de Nippon Roche Co., Ltd. como Vesanoid (nombre comercial); alefacept de Biogen Idec Inc. como Amevive (nombre comercial); darbepoetina alfa de Amgen Inc. como Aranesp (nombre comercial); anastrozol de AstraZeneca Corp. como Arimidex (nombre comercial); exemestano de Pfizer Inc. como Aromasin (nombre comercial); bicalutamida de AstraZeneca Corp. como Casodex (nombre comercial); leuprorelina de Takeda Pharmaceutical Co., Ltd. como Leuplin (nombre comercial); flutamida de Schering-Plough Corp. como Eulexin (nombre comercial); fulvestrant de AstraZeneca Corp. como Faslodex (nombre comercial); pegaptanib octasodio de Gilead Sciences, Inc. como Macugen (nombre comercial); denileukina diftotox de Ligand Pharmaceuticals Inc. como Ontak (nombre comercial); aldesleukina de Chiron Corp. como Proleukin (nombre comercial); tirotropina alfa de Genzyme Corp. como Thyrogen (nombre comercial); trióxido arsénico de Cell Therapeutics, Inc. como Trisenox (nombre comercial); bortezomib de Millennium Pharmaceuticals, Inc. como Velcade (nombre comercial); capecitabina de Hoffmann-La Roche,

Ltd. como Xeloda (nombre comercial); y goserelina de AstraZeneca Corp. como Zoladex (nombre comercial). El término "agente antitumoral" como se usa en la especificación incluye el agente alquilante antitumoral, antimetabolito antitumoral, antibiótico antitumoral, agente antitumoral obtenido de plantas, compuesto de coordinación de platino antitumoral, derivado de camptotecina antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa antitumoral, anticuerpo monoclonal, interferón, modificador de la respuesta biológica, y otros agentes antitumorales descritos anteriormente.

[0075] Otros agentes anti-tumorales o agentes anti-neoplásicos pueden usarse en combinación con compuestos benzopirona. Dichos agentes anti-tumorales o anti-neoplásicos adecuados incluyen, pero no están limitados a, Ácido 13-cis-Retinoico, 2-CdA, 2-Clorodesoxiadenosina, 5-Azacidina, 5-Fluorouracilo, 5-FU, 6-Mercaptopurina, 6-MP, 6-TG, 6-Tioguanina, Abraxano, Accutane, Actinomicina-D, Adriamicina, Adrucil, Agrilina, Ala-Cort, Aldesleuquina, Alemtuzumab, ALIMTA, Alitretinoina, Alkaban-AQ, Alkeran, Ácido todo-transretinoico, Interferón Alfa, Altretamina, Ametopterina, Amifostina, Aminoglutetimida, Anagrelida, Anandron, Anastrozol, Arabinosilcitosina, Ara-C, Aranesp, Aredia, Arimidex, Aromasina, Arranon, Trióxido Arsénico, Asparaginasa, ATRA, Avastina, Azacidina, BCG, BCNU, Bendamustina, Bevacizumab, Bexaroteno, BEXXAR, Bicalutamida, BiCNU, Blenoxano, Bleomicina, Bortezomib, Busulfán, Busulfex, C225, Leucovorina de Calcio, Campath, Camptosar, Camptotecina-11, Capecitabina, Carac, Carboplatino, Carmustina, Carmustina Wafer, Casodex, CC-5013, CCI-779, CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidina, Cetuximab, Clorambucilo, Cisplatino, Factor Citrovorum, Cladribina, Cortisona, Cosmegen, CPT-11, Ciclofosfamida, Citadren, Citarabina, Citarabina Liposomal, Citosar-U, Citoxan, Dacarbazina, Dacogen, Dactinomicina, Darbepoetina Alfa, Dasatinib, Daunomicina, Daunorubicina, Hidrocloruro de Daunorubicina, Daunorubicina Liposomal, DaunoXoma, Decadron, Decitabina, Delta-Cortef, Deltasona, Denileukin Diftitox, DepoCyt™, Dexametasona, Acetato de Dexametasona, Fosfato Sódico de Dexametasona, Dexasona, Dexrazoxana, DHAD, DIC, Diodex, Docetaxel, Doxil, Doxorubicina, Doxorubicina Liposomal, Droxia™, DTIC, DTIC-Dome, Duralona, Efudex, Eligard, Ellence, Eloxatina, Elspar, Emcyt, Epirubicina, Epoetina Alfa, Erbitux, Erlotinib, L-asparaginasa de Erwinia, Estramustina, Etiol, Etopofos, Etopósido, Fosfato de Etopósido, Eulexina, Evista, Exemestano, Fareston, Faslodex, Femara, Filgrastim, Floxuridina, Fludara, Fludarabina, Fluoroplex, Fluorouracilo, Fluorouracilo (crema), Fluoximesterona, Flutamida, Ácido Folinico, FUDR, Fulvestrant, G-CSF, Gefitinib, Gemcitabina, Gemtuzumab ozogamicina, Gemzar & Gemzar Efectos Secundarios - Fármacos Quimioterapéuticos, Gleevec, Gliadel Wafer, GM-CSF, Goserelina, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos Macrófagos, Halotestina, Herceptina, Hexadrol, Hexalen, Hexametilmelamina, HMM, Hicamtina, Hidrea, Acetato de Hidrocort, Hidrocortisona, Fosfato Sódico de Hidrocortisona, Succinato Sódico de Hidrocortisona, Fosfato de Hidrocortona, Hidroxiurea, Ibritumomab, Ibritumomab Tiuxetán, Idamicina, Idarubicina, Ifex, IFN-alfa, Ifosfamida, IL-11, IL-2, mesilato de Imatinib, Imidazol Carboxamida, Interferón alfa, Interferón Alfa-2b (Conjugado con PEG), Interleuquina-2, Interleuquina-11, Intrón A (interferón alfa-2b), Iressa, Irinotecán, Isotretinoina, Ixabepilona, Ixempra, Kidrolasa (t), Lanacort, Lapatinib, L-asparaginasa, LCR, Lenalidomida, Letrozol, Leucovorina, Leukeran, Leukina, Leuprólido, Leurocristina, Leustatina, Ara-C Liposomal, Pred Líquido, Lomustina, L-PAM, L-Sarcolisina, Luprón, Luprón Depot, Matulano, Maxidex, Mecloretamina, Hidrocloruro de Mecloretamina, Medralona, Medrol, Megace, Megestrol, Acetato de Megestrol, Melfalán, Mercaptopurina, Mesna, Mesnex, Metotrexato, Metotrexato Sódico, Metilprednisolona, Meticorten, Mitomicina, Mitomicina-C, Mitoxantrona, M-Prednisol, MTC, MTX, Mustargen, Mustina, Mutamicina, Mileran, Milocel, Milotarg, Navelbina, Nelarabina, Neosar, Neulasta, Neumega, Neupogén, Nexavar, Nilandrón, Nilutamida, Nipent, Mostaza de Nitrógeno, Novaldex, Novantrona, Octreotido, acetato de

Octreotido, Oncospar, Oncovina, Ontak, Onxal, Oprevelkina, Orapred, Orasona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Paclitaxel unido a Proteína, Pamidronato, Panitumumab, Panretina, Paraplatino, Pediapred, PEG Interferón, Pegaspargasa, Pegfilgrastima, PEG-INTRON, PEG-L-asparaginasa, PEMETREXED, Pentostatina, Mostaza de Fenilalanina, Platinol, Platinol-AQ, Prednisolona, Prednisona, Prelona, Procarbazina, PROCIT, Proleuquina, Prolifeprospan 20 con Implante de Carmustina, Purinetol, Raloxifeno, Revlimid, Reumatex, Rituxán, Rituximab, Roferón-A (Interferón Alfa-2a), Rubex, hidrocloreto de Rubidomicina, Sandostatina, Sandostatina LAR, Sargramostima, Solu-Cortef, Solu-Medrol, Sorafenib, SPRYCEL, STI-571, Estreptozocina, SU11248, Sunitinib, Sutent, Tamoxifeno, Tarceva, Targretina, Taxol, Taxotere, Temodar, Temozolomida, Temsirolimus, Tenipósido, TESP, Talidomida, Talomida, TeraCys, Tioguanina, Tioguanina Tabloid, Tiofosfoamida, Tioplex, Tiotepa, TICE, Toposar, Topotecán, Toremifeno, Torisel, Tositumomab, Trastuzumab, Tretinoína, Trexall™, Trisenox, TSPA, TYKERB, VCR, Vectibix, Vectibix, Velbán, Velcade, VePesid, Vesanoid, Viadur, Vidaza, Vinblastina, Sulfato de Vinblastina, Vincasar Pfs, Vincristina, Vinorelbina, tartrato de Vinorelbina, VLB, VM-26, Vorinostat, VP-16, Vumon, Xeloda, Zanosar, Zevalina, Zinecard, Zoladex, ácido Zoledrónico, Zolanza, Zometa.

Antimetabolitos:

[0076] Los antimetabolitos son fármacos que interfieren con los procesos metabólicos celulares normales. Como las células cancerosas se replican rápidamente, la interferencia con el metabolismo celular afecta a las células cancerosas en mayor medida que a las células del anfitrión. La gemcitabina (4-amino-1-[3,3-difluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2-ona; comercializada como GEMZAR® por Eli Lilly and Company) es un análogo de nucleósido, que interfiere con la división celular mediante el bloqueo de la síntesis de ADN, resultando así en la muerte celular, aparentemente a través de un mecanismo apoptótico. La dosificación de gemcitabina puede ajustarse al paciente particular. En adultos, la dosificación de gemcitabina, cuando se usa en combinación con un agente de platino y un inhibidor de PARP, estará en el intervalo de aproximadamente límite 100 mg/m² a aproximadamente 5.000 mg/m², en el intervalo de aproximadamente 100 mg/m² a aproximadamente 2.000 mg/m², en el intervalo de aproximadamente 750 a aproximadamente 1.500 mg/m², aproximadamente 900 a aproximadamente 1.400 mg/m² o aproximadamente 1.250 mg/m². Las dimensiones mg/m² se refieren a la cantidad de gemcitabina en miligramos (mg) por unidad de área superficial del paciente en metros cuadrados (m²). La gemcitabina puede administrarse por infusión intravenosa (IV), p. ej. durante un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 minutos, aproximadamente 15 a aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 20 a aproximadamente 60 minutos o aproximadamente 10 minutos. El término “aproximadamente” en este contexto indica el uso normal de aproximadamente; y en algunas realizaciones indica una tolerancia de $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$.

Complejos de platino:

[0077] Los complejos de platino son composiciones farmacéuticas usadas para tratar cáncer, que contienen al menos un centro de platino formando un complejo con al menos un grupo orgánico. El carboplatino ((SP-4-2)-Diamina[1,1-ciclobutanodicarboxilato(2-)-O,O' platino), como cisplatino y oxaliplatino, es un agente alquilante del ADN. La dosificación de carboplatino se determina calculando el área bajo la curva (AUC) de concentración en el plasma sanguíneo por métodos conocidos por los expertos en la técnica de la quimioterapia del cáncer, teniendo en cuenta la velocidad de aclaramiento de la creatinina del paciente. En algunas realizaciones, la dosificación de carboplatino para un tratamiento de combinación junto con un antimetabolito (p. ej. gemcitabina) y un inhibidor de PARP (p. ej. 4-yodo-3-nitrobenzamida) se calcula para proporcionar una AUC de aproximadamente 0,1-6 mg/ml/min, aproximadamente 1-3 mg/ml/min, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mg/ml/min,

aproximadamente 1,75 a aproximadamente 2,25 mg/ml/min o aproximadamente 2 mg/ml/min. (2 AUC, por ejemplo, es la abreviatura para 2 mg/ml/min.) En algunas realizaciones, la dosificación de carboplatino para un tratamiento de combinación junto con un taxano (p. ej. paclitaxel o docetaxel) y un inhibidor de PARP (p. ej. 4-yodo-3-nitrobenzamida) se calcula para proporcionar una AUC de aproximadamente 0,1-6 mg/ml/min, aproximadamente 1-3 mg/ml/min, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mg/ml/min, aproximadamente 1,75 a aproximadamente 2,25 mg/ml/min o aproximadamente 2 mg/ml/min. (2 AUC, por ejemplo, es la abreviatura para 2 mg/ml/min.). En algunas realizaciones, se administra una dosis adecuada de carboplatino aproximadamente 10 a aproximadamente 400 mg/m², p. ej. aproximadamente 360 mg/m². Los complejos de platino, tales como carboplatino, se administran normalmente por vía intravenosa (IV) durante un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 minutos, aproximadamente 30 a aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 45 a aproximadamente 120 minutos o aproximadamente 60 minutos. En este contexto, el término “aproximadamente” tiene su significado normal de aproximadamente. En algunas realizaciones, aproximadamente significa $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$.

Inhibidores de topoisomerasa

[0078] En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender administrar a un paciente con cáncer de mama una cantidad eficaz de un inhibidor de PARP en combinación con un inhibidor de topoisomerasa, por ejemplo, irinotecán o topotecán.

[0079] Los inhibidores de topoisomerasa son agentes diseñados para interferir con la acción de las enzimas topoisomerasa (topoisomerasa I y II), que son enzimas que controlan los cambios en la estructura del ADN catalizando la rotura y reunión del núcleo fosfodiéster de las cadenas de ADN durante el ciclo celular normal. Las topoisomerasas se han vuelto dianas populares para los tratamientos de cáncer con quimioterapia. Se piensa que los inhibidores de topoisomerasa bloquean la etapa de ligado del ciclo celular, generando roturas de cadena sencilla y doble que dañan la integridad del genoma. La introducción de esas roturas da lugar posteriormente a la apoptosis y la muerte celular. Los inhibidores de topoisomerasa se dividen a menudo según el tipo de enzima que inhiben. La topoisomerasa I, el tipo de topoisomerasa que se encuentra más habitualmente en eucariotas, es diana de topotecán, irinotecán, lurtotecán y exatecán, cada uno de los cuales está disponible comercialmente. Topotecán está disponible en GlaxoSmithKline con el nombre comercial Hycamtin®. Irinotecán está disponible en Pfizer con el nombre comercial Camptosar®. Lurtotecán puede obtenerse como una formulación liposomal en Gilead Sciences Inc. Los inhibidores de topoisomerasa pueden administrarse a una dosis eficaz. En algunas realizaciones una dosis eficaz para el tratamiento de un ser humano estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/m²/día. El tratamiento puede repetirse de manera diaria, cada dos semanas, dos veces por semana, semanal o mensual. En algunas realizaciones, un periodo de tratamiento puede seguirse de un periodo de descanso desde un día a varios días, o desde una a varias semanas. En combinación con un inhibidor de PARP-1, el inhibidor de PARP-1 y el inhibidor de topoisomerasa pueden dosificarse en el mismo día o pueden dosificarse en días diferentes.

[0080] Los compuestos dirigidos al tipo II de topoisomerasa se dividen en dos clases principales: tóxicos de topoisomerasa, que están dirigidos al complejo topoisomerasa-ADN, e inhibidores de topoisomerasa, que alteran la velocidad de recambio catalítica. Los tóxicos para topo II incluyen pero no están limitados a inhibidores del tipo II de topoisomerasa (topo II) eucariota: amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido y doxorubicina. Estos fármacos son terapias anti-cancerosas. Los ejemplos de inhibidores de topoisomerasa incluyen ICRF-193. Estos inhibidores están dirigidos contra el dominio N-terminal de la

ATPasa de topo II y evitan el recambio de topo II. La estructura de este compuesto unido al dominio de la ATPasa lo ha resuelto Classen (Proceedings of the National Academy of Science, 2004) mostrando que el fármaco se une de una manera no competitiva e impide la dimerización del dominio de la ATPasa.

Agentes anti-angiogénicos

[0081] En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender administrar a un paciente con cáncer de mama una cantidad eficaz de un inhibidor de PARP en combinación con un agente anti-angiogénico.

[0082] Un inhibidor de la angiogénesis es una sustancia que inhibe la angiogénesis (el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos). Cada tumor sólido (en contraste con la leucemia) necesita generar vasos sanguíneos para mantenerlo vivo una vez que alcanza un cierto tamaño. Los tumores sólo pueden crecer si forman nuevos vasos sanguíneos. Habitualmente, los vasos sanguíneos no se forman en otro lugar de un cuerpo adulto a no ser que esté realizándose activamente una reparación tisular. El agente angiostático endostatina y químicos relacionados pueden suprimir la formación de vasos sanguíneos, evitando que el cáncer crezca indefinidamente. En ensayos con pacientes, el tumor se vuelve inactivo y permanece de esta manera incluso después de que acabara el tratamiento con endostatina. El tratamiento tiene muy pocos efectos secundarios pero parece tener una selectividad muy limitada. Otros agentes angiostáticos tales como talidomida y las sustancias naturales basadas en plantas se están investigando activamente.

[0083] Los inhibidores conocidos incluyen el fármaco bevacizumab (Avastina), que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), inhibiendo su unión a los receptores que estimulan la angiogénesis. Otros agentes anti-angiogénicos incluyen pero no están limitados a carboxiamidotriazol, TNF-470, CM101, IFN-alfa, IL-12, factor de plaquetas-4, suramina, SU5416, trombospondina, esteroides angiostáticos + heparina, factor inhibidor de la angiogénesis derivado de cartílago, inhibidores de metaloproteinasa de matriz, angiostatina, endostatina, 2-metoxiestradiol, tecogalán, trombospondina, prolactina, inhibidores de $\alpha_v\beta_3$ y linomida.

Terapia dirigida a Her-2

[0084] En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender administrar a un paciente con cáncer de mama HER2-positivo una cantidad eficaz de un inhibidor de PARP en combinación con Herceptina.

[0085] La herceptina (trastuzumab) es una terapia dirigida para usarse en los cánceres de mama HER2-positivos en un estadio temprano. La herceptina está aprobada para el tratamiento adyuvante de cáncer de mama que sobreexpresa HER2, nódulo-positivo o nódulo-negativo (ER/PR-negativo o con una característica de alto riesgo). La herceptina puede usarse de varias maneras diferentes: como parte de un régimen de tratamiento que incluye doxorubicina, ciclofosfamida, y bien paclitaxel o docetaxel; con docetaxel y carboplatino; o como un único agente después de terapia multi-modalidad basada en antraciclina. La herceptina en combinación con paclitaxel está aprobada para el tratamiento de primera línea de cáncer de mama metastásico que sobreexpresa HER2. La herceptina como único agente está aprobada para el tratamiento de cáncer de mama que sobreexpresa HER2 en pacientes que han recibido uno o más regímenes de quimioterapia para enfermedad metastásica.

[0086] Lapatinib o ditosilato de lapatinib es un tratamiento con fármaco quimioterapéutico activo oralmente para tumores sólidos tales como cáncer de mama. Durante el desarrollo se conocía como molécula pequeña GW572016. A los pacientes que cumplen los criterios de indicación específicos se les puede prescribir lapatinib como parte de una terapia de combinación para el cáncer de mama. Farmacológicamente, lapatinib es un inhibidor dual de tirosina quinasa que interrumpe las señales celulares que causan cáncer. Lapatinib se usa como un tratamiento para el cáncer de mama de mujeres en pacientes que tienen cáncer de mama HER2-positivo avanzado que ha progresado después de tratamiento previo con otros agentes quimioterapéuticos, tales como antraciclina, fármacos derivados del taxano, o trastuzumab (Herceptina, Genentech).

Terapia hormonal

[0087] En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender administrar a un paciente con cáncer de mama una cantidad eficaz de un inhibidor de PARP en combinación con terapia hormonal.

[0088] Existen ciertas hormonas que pueden unirse a las células cancerosas y pueden afectar su capacidad de multiplicarse. El propósito de la terapia hormonal es añadir, bloquear o eliminar hormonas. Con el cáncer de mama, las hormonas femeninas estrógeno y progesterona pueden estimular el crecimiento de algunas células de cáncer de mama. Por lo tanto, en estos pacientes, la terapia hormonal se proporciona para bloquear el estrógeno natural del cuerpo y luchar contra el crecimiento del cáncer. Existen dos tipos de terapia hormonal para el cáncer de mama: fármacos que inhiben que el estrógeno y la progesterona estimulen el crecimiento de las células de cáncer de mama y fármacos o cirugía que impiden la producción de hormonas en los ovarios.

[0089] Los fármacos usados habitualmente para la terapia hormonal del cáncer de mama incluyen pero no están limitados a Tamoxifeno, Fareston, Arimidex, Aromasin, Femara, y Zoladex.

Tamoxifeno-Antagonista hormonal

[0090] El tamoxifeno (comercializado como Nolvadex) disminuye la probabilidad de que algunos cánceres de mama en estadio temprano recurran y puede evitar el desarrollo del cáncer en la mama no afectada. El tamoxifeno también ralentiza o detiene el crecimiento de las células cancerosas presentes en el cuerpo. Además, el tamoxifeno puede ofrecer una alternativa a una mastectomía esperada en observación o profiláctica (preventiva) en mujeres con un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama. El tamoxifeno es un tipo de fármaco denominado un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM). En la mama, funciona como un anti-estrógeno. El estrógeno estimula el crecimiento de las células del cáncer de mama y el tamoxifeno bloquea la unión del estrógeno a los receptores de estrógeno en estas células. Haciendo esto, se cree que se detendrá el crecimiento de las células de cáncer de mama. El tamoxifeno se proporciona a menudo con quimioterapia y otros tratamientos del cáncer de mama. Se considera una opción en los casos siguientes: Tratamiento de carcinoma ductal in situ (DCIS) junto con cirugía de conservación de la mama o mastectomía; Tratamiento adyuvante del carcinoma lobular in situ (LCIS) para reducir el riesgo de desarrollar cáncer de mama más avanzado; Tratamiento adyuvante de cáncer de mama metastásico en hombres y mujeres cuyos cánceres son positivos para el receptor de estrógeno; Tratamiento de cáncer de mama recurrente; Para evitar el cáncer de mama en mujeres con un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Inhibidor de aromatasa esteroideal y no-esteroideal

[0091] Los inhibidores de aromatasa (AI) son una clase de fármacos usada en el tratamiento de cáncer de mama y cáncer de ovarios en mujeres postmenopáusicas que bloquean la enzima aromatasa. Los inhibidores de aromatasa disminuyen la cantidad de estrógeno en mujeres post-menopáusicas que tienen cáncer de mama positivo para receptores hormonales. Con menos estrógeno en el cuerpo, los receptores hormonales reciben menos señales de crecimiento, y el crecimiento del cáncer puede ralentizarse o detenerse.

[0092] Las medicaciones con inhibidores de aromatasa incluyen Arimidex (nombre químico: anastrozol), Aromasin (nombre químico: exemestano), y Femara (nombre químico: letrozol). Cada uno se toma mediante píldora una vez al día, durante hasta cinco años. Pero para las mujeres con enfermedad avanzada (metastásica), la medicina se continúa siempre que funcione bien.

[0093] Los AI se clasifican en dos tipos: inhibidores esteroideos irreversibles tales como exemestano que forman una unión permanente con el complejo de la enzima aromatasa; e inhibidores no-esteroideos (tales como anastrozol, letrozol) que inhiben la enzima por competición reversible.

[0094] Fulvestrant, también conocido como ICI 182,780, y "Faslodex" es un tratamiento con fármacos de cáncer de mama metastásico positivo para receptores hormonales en mujeres postmenopáusicas con progresión de la enfermedad después de terapia anti-estrógeno. Es un antagonista del receptor de estrógeno sin efectos agonistas, que funciona tanto regulando a la baja como degradando el receptor de estrógeno. Se administra como una inyección mensual.

Terapia dirigida

[0095] En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden comprender administrar a un paciente con cáncer de mama una cantidad eficaz de un inhibidor de PARP en combinación con un inhibidor dirigido a un receptor de factor de crecimiento incluyendo pero sin limitarse a receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor del factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF1R).

[0096] EGFR está sobreexpresado en las células de determinados tipos de carcinomas humanos incluyendo pero sin limitarse a cánceres de pulmón y de mama. Las células de cáncer de mama altamente proliferativas e invasivas expresan a menudo niveles anormalmente altos de EGFR, y se sabe que esto controla tanto la división como la migración celular. El interés en EGFR se incrementa más por la disponibilidad y la aprobación por la FDA de inhibidores de tirosina quinasa específicos de EGFR, por ejemplo, Gefitinib. La inhibición de EGFR es un tratamiento anti-canceroso importante. Los ejemplos de inhibidores de EGFR incluyen pero no están limitados a cetuximab, que es un anticuerpo monoclonal quimérico proporcionado por inyección intravenosa para el tratamiento de cánceres incluyendo pero sin limitarse a cáncer colorrectal metastásico y cáncer de la cabeza y el cuello. Panitumumab es otro ejemplo de inhibidor de EGFR. Es un anticuerpo monoclonal humanizado frente a EGFR. Se ha mostrado que Panitumumab es beneficioso y mejor que el tratamiento sintomático cuando se usa solo en pacientes con cáncer de colon avanzado y está aprobado por la FDA para este uso.

[0097] La activación del receptor del factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF1R) estimula la proliferación e inhibe la apoptosis en varios tipos de células. Ratones transgénicos que expresan un IGF1R o IGF-1 constitutivamente activo desarrollan tumores mamarios y se han detectado niveles incrementados de IGF1R en cánceres de mama primarios (Yanochko et.al. *Breast Cancer Research* 2006). También se ha mostrado que el receptor del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF1R) y HER2 muestran interacciones en la señalización importantes en el cáncer de mama. Los inhibidores específicos de uno de estos receptores puede inhibir de manera cruzada la actividad del otro. Si se toman los dos receptores como diana se proporciona la máxima inhibición de sus vías de señalización posteriores reguladas por señales extracelulares de la quinasa 1/2 y AKT. Por lo tanto, dichas combinaciones de fármacos pueden ser clínicamente útiles y pueden ser beneficiosas incluso en tumores en los que los fármacos únicos son inactivos, como se ejemplifica por el efecto de la combinación de inhibidores de HER2/IGF1R en células MCF7 que no sobreexpresan HER2 (Chakraborty AK, et.al, Cancer Res. 2008 Mar 1;68(5):1538-45). Un ejemplo de un inhibidor de IGF1R es CP-751871. CP-751871 es un anticuerpo monoclonal humano que se une selectivamente a IGF1R, evitando que IGF1 se una al receptor y la posterior autofosforilación del receptor. La

inhibición de la autofosforilación de IGF1R puede resultar en una reducción de la expresión del receptor en células tumorales que expresan IGF1R, una reducción en el efecto anti-apoptótico de IGF, e inhibición del crecimiento tumoral. IGF1R es un receptor con tirosina quinasa expresado en la mayoría de las células tumorales y está implicado en la mitogénesis, angiogénesis, y supervivencia de las células tumorales.

Vía PI3K/mTOR

[0098] La desregulación de la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) es un evento común en el cáncer humano, bien a través de la inactivación de la fosfatasa supresora de tumores y el homólogo de la tensina deletado del cromosoma 10 o la activación de mutaciones de p110- α . Estas mutaciones en puntos críticos resultan en actividad oncogénica de la enzima y contribuyen a la resistencia terapéutica al anticuerpo anti-HER2 trastuzumab. La vía PI3K es, por lo tanto, una diana atractiva para la terapia del cáncer. Se ha mostrado que NVP-BEZ235, un inhibidor dual de PI3K y la diana de mamíferos posterior de rapamicina (mTOR) inhibe la activación de los efectores posteriores Akt, proteína ribosomal S6 y 4EBP1 en células de cáncer de mama. NVP-BEZ235 inhibe el eje PI3K/mTOR y resulta en actividad antiproliferativa y antitumoral en células de cáncer tanto con p110- α de tipo salvaje como mutado (Violeta Serra, et.al. *Cancer Research* 68, 8022-8030, 1 de octubre, 2008).

Inhibidores de Hsp90

[0099] Estos fármacos están dirigidos a la proteína de choque térmico 90 (hsp90). Hsp90 es una de una clase de proteínas chaperonas, cuya función normal es ayudar a otras proteínas a adquirir y mantener la forma requerida para que esas proteínas lleven a cabo sus funciones. Las proteínas chaperonas funcionan estando en contacto físico con otras proteínas. Hsp90 también puede permitir que las células cancerosas sobrevivan e incluso crezcan a pesar de defectos genéticos que normalmente causarían la muerte de estas células. Así, el bloqueo de la función de HSP90 y de proteínas chaperonas relacionadas puede causar la muerte de las células cancerosas, especialmente si el bloqueo de la función chaperona se combina con otras estrategias para bloquear la supervivencia de las células cancerosas.

Inhibidores de tubulina

[00100] Las tubulinas son proteínas que forman microtúbulos, que son componentes clave del citoesqueleto celular (red estructural). Los microtúbulos son necesarios para la división celular (mitosis), estructura, transporte, señalización y motilidad celulares. Dado su papel fundamental en la mitosis, los microtúbulos han sido una diana importante para los fármacos anticancerosos — a menudo referidos como fármacos antimitóticos, inhibidores de tubulina y agentes dirigidos a microtúbulos. Estos compuestos se unen a la tubulina en los microtúbulos y evitan la proliferación de las células cancerosas interfiriendo con la formación de microtúbulos requerida para la división celular. Esta interferencia bloquea la secuencia del ciclo celular, dando lugar a apoptosis.

Inhibidores de la apoptosis

[00101] Los inhibidores de la apoptosis (IAP) son una familia de proteínas funcionalmente - y estructuralmente - relacionadas, caracterizadas originalmente en Baculovirus, que sirven como inhibidores endógenos de la apoptosis. La familia IAP humana consiste en al menos 6 miembros y se han identificado homólogos de IAP en numerosos organismos. 10058-F4 es un inhibidor de c-Myc que induce la parada del ciclo celular y la apoptosis. Es una tiazolidinona permeable para las células que inhibe específicamente la interacción c-Myc-Max y evita la transactivación de la expresión génica dirigida por c-Myc. 10058-F4 inhibe el crecimiento de las células tumorales de una manera dependiente de c-Myc tanto *in vitro* como *in vivo*. BI-6C9 es un inhibidor de tBid y un antiapoptótico. GNF-2 pertenece a una nueva clase de inhibidores de Bcr-abl. GNF-2 parece que se une al bolsillo de unión miristoilo, un sitio alostérico distante del sitio activo,

estabilizando la forma inactiva de la quinasa. Inhibe la fosforilación de Bcr-abl con una CI_{50} de 267 nM, pero no inhibe un panel de 63 quinasas adicionales, incluyendo c-Abl nativa, y muestra una ausencia completa de toxicidad frente a células que no expresan Bcr-Abl. GNF-2 muestra un gran potencial para una nueva clase de inhibidores para estudiar la actividad de Bcr-abl y para tratar la leucemia mielógena crónica (CML) resistente, que está causada por la oncoproteína Bcr-Abl. Pifitrina- α es un inhibidor reversible de la apoptosis mediada por p53 y la transcripción génica mediada por p53 tal como la expresión de ciclina G, p21/waf1, y mdm2. Pifitrina- α incrementa la supervivencia celular después de un estrés genotóxico tal como irradiación UV y tratamiento con compuestos citotóxicos incluyendo doxorubicina, etopóxido, paclitaxel, y citosina- β -D-arabinofuranósido. Pifitrina- α protege a los ratones de la irradiación y de cuerpo completo letal sin un incremento en la incidencia de cáncer.

Inhibidores de PARP:

[00102] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama que es negativo para al menos uno de ER, PR, o HER2, administrando a un sujeto que lo necesite al menos un inhibidor de PARP. En otras realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar cáncer de mama administrando a un sujeto que lo necesite al menos un inhibidor de PARP en combinación con al menos un agente anti-tumoral como se describe en la presente memoria.

[00103] Sin pretender que estén limitados a ningún mecanismo particular de acción, se cree que los compuestos descritos en la presente memoria tienen propiedades anti-cancerosas debido a la modulación de la actividad de una poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Este mecanismo de acción está relacionado con la capacidad de los inhibidores de PARP de unirse a PARP y disminuir su actividad. PARP cataliza la conversión del dinucleótido de β -nicotinamida adenina (NAD^+) en nicotinamida y poli-ADP-ribosa (PAR). Tanto poli (ADP-ribosa) como PARP se han asociado con la regulación de la transcripción, proliferación celular, estabilidad genómica, y carcinogénesis (Bouchard V.J. et.al. *Experimental Hematology*, Volumen 31, Número 6, junio 2003, p. 446-454(9); Herceg Z.; Wang Z.-Q. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volumen 477, Número 1, 2 de junio 2001, p. 97-110(14)). La poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) es una molécula clave en la reparación de roturas de ADN de cadena sencilla (SSB) (de Murcia J, et al. 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7303–7307; Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517–528; Wang ZQ, et al. (1997) *Genes Dev* 11:2347–2358). La inactivación génica de la reparación de SSB por inhibición de la función de PARP1 induce roturas de ADN de doble cadena (DSB) que pueden desencadenar una letalidad sintética en las células cancerosas con reparación defectuosa de DSB dependiente de homología (Bryant HE, et al. (2005) *Nature* 434:913–917; Farmer H, et al. (2005) *Nature* 434:917–921).

[00104] BRCA1 y BRCA2 actúan como un componente integral de la maquinaria de recombinación homóloga (HR) (Narod SA, Foulkes WD (2004) *Nat Rev Cancer* 4:665–676; Gudmundsdottir K, Ashworth A (2006) *Oncogene* 25:5864–5874).

[00105] Las células defectuosas en BRCA1 o BRCA2 tienen un defecto en la reparación de roturas de doble cadena (DSB) por el mecanismo de recombinación homóloga (HR) por conversión génica (Farmer H, et al. (2005) *Nature* 434:917–921; Narod SA, Foulkes WD (2004) *Nat Rev Cancer* 4:665–676; Gudmundsdottir K, Ashworth A (2006) *Oncogene* 25:5864–5874; Helleday T, et al. (2008) *Nat Rev Cancer* 8:193–204). La deficiencia en cualquiera de las proteínas de susceptibilidad del cáncer de mama BRCA1 o BRCA2 induce una gran sensibilidad celular a la inhibición de la actividad de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), resultando en la parada del ciclo celular y apoptosis. Se ha publicado que el papel crítico de BRCA1 y BRCA2 en la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga (HR) es la razón

subyacente para esta sensibilidad, y la deficiencia de RAD51, RAD54, DSS1, RPA1, NBS1, ATR, ATM, CHK1, CHK2, FANCD2, FANCA, o FANCC induce dicha sensibilidad (McCabe N. et.al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition, *Cancer research* 2006, vol. 66, 8109-8115). Se ha propuesto que la inhibición de PARP1 puede ser una terapia específica para los cánceres con defectos en *BRCA1/2* u otros componentes de la vía HR (Helleday T, et al. (2008) *Nat Rev Cancer* 8:193–204). Los tumores triple-negativos representan el 15% de todos los cánceres de mama y frecuentemente presentan defectos en la reparación de la rotura de ADN de doble cadena a través de recombinación homóloga (HR), tal como disfunción de BRCA1 (Rottenberg S, et.al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 4;105(44):17079-84).

[00106] La inhibición de la actividad de una molécula de PARP incluye reducir la actividad de estas moléculas. El término “inhibe” y sus conjugaciones gramaticales, tales como “inhibidor,” no se pretende que requieran la reducción completa de la actividad de PARP. En algunas realizaciones, dicha reducción es al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% de la actividad de la molécula en ausencia del efecto inhibidor, p. ej., en ausencia de un inhibidor, tal como un compuesto nitrobenzamida de la invención. En algunas realizaciones, la inhibición se refiere a una reducción de la actividad observable o mensurable. En el tratamiento de algunos casos, la inhibición es suficiente para producir un beneficio terapéutico y/o profiláctico en la condición que se está tratando. La expresión “no inhibe” y sus conjugaciones gramaticales no requiere una ausencia completa de efecto en la actividad. Por ejemplo, se refiere a situaciones en las que hay menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 10%, y preferiblemente menos de aproximadamente 5% de reducción en la actividad de PARP en presencia de un inhibidor tal como un compuesto nitrobenzamida de la invención.

[00107] La poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) es una enzima esencial en la reparación del ADN, jugando así un papel potencial en la resistencia a la quimioterapia. Se piensa que tomar PARP como diana potencialmente interrumpe la reparación del ADN, incrementando de esta manera la replicación y/o reparación del ADN en las células cancerosas mediada por taxanos, mediada por antimetabolitos, mediada por inhibidores de topoisomerasa, y mediada por inhibidores del receptor de factores de crecimiento, p. ej. mediada por inhibidor de IGF1R y/o mediada por complejos de platino. Los inhibidores de PARP también pueden ser muy activos frente a los cánceres de mama con una función alterada de BRCA 1 y BRCA2 o en aquellos pacientes con otros defectos en la vía de reparación del ADN. Los cánceres de mama primarios ER, PR, HER2-negativos demuestran una regulación al alza de PARP. Este subtipo de cáncer de mama tiene un riesgo 9 veces mayor de tener una mutación en BRCA-1 y puede tener defectos adicionales en las vías de reparación del ADN de la anemia de Fanconi.

[00108] La 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) es una molécula pequeña que actúa en las células tumorales sin ejercer efectos tóxicos en las células normales. Se cree que BA consigue su efecto anti-neoplásico por inhibición de PARP. BA es muy lipofílica y se distribuye rápidamente y ampliamente en los tejidos, incluyendo el cerebro y el fluido cerebroespinal (CSF). Es activa frente a un amplio rango de células cancerosas in vitro, incluyendo frente a líneas celulares resistentes a fármacos. El experto en la técnica reconocerá que BA puede administrarse en cualquier forma farmacéuticamente aceptable, p. ej. como una sal, solvato, o complejo farmacéuticamente aceptable. Además, como BA es capaz de tautomerizarse en disolución, se pretende que la forma tautomérica de BA esté englobada por el término BA (o el equivalente 4-yodo-3-nitrobenzamida), junto con las sales, solvatos o complejos. En algunas realizaciones, BA puede administrarse en combinación con una ciclodextrina, tal como hidroxipropilbetaciclodextrina. Sin embargo, el experto en la técnica reconocerá que otros agentes activos e inactivos pueden combinarse con BA; y el

recitado de BA incluirá, a no ser que se indique de otra forma, todas las formas farmacéuticamente aceptables de ésta.

[00109] Los cánceres de mama similares al basal tiene una alta propensión a metastatizar en el cerebro; y se sabe que BA cruza la barrera hematoencefálica. Aunque no se desea la vinculación a ninguna teoría particular, se cree que BA consigue su efecto anti-neoplásico mediante la inhibición de la función de PARP. En algunas realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama metastásicos triple negativos. En algunas realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en los que al menos uno de ER, PR, y Her2 es negativo. En algunas realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en los que al menos dos de ER, PR, y Her2 es negativo, p. ej. ER-negativo, PR-negativo, y Her-2 positivo; o ER-positivo, PR-negativo, y Her-2 negativo; o ER-negativo, PR-positivo, y Her-2 negativo.

[00110] En algunas realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en combinación con un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, el agente anti-tumoral es un agente alquilante antitumoral, antimetabolito antitumoral, antibióticos antitumorales, agente antitumoral obtenido de plantas, complejo de platino antitumoral, derivado de camptotecina antitumoral, inhibidor de tirosina quinasa antitumoral, anticuerpo monoclonal, interferón, modificador de la respuesta biológica, agente hormonal anti-tumoral, agente viral anti-tumoral, inhibidor de la angiogénesis, agente de diferenciación, u otro agente que presente actividades anti-tumorales, o una sal farmacéuticamente aceptable de éstos. En otras realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en combinación con un antimetabolito tal como gemcitabina y un complejo de platino tal como carboplatino. En otras realizaciones más, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama metastásicos en combinación con un taxano tal como paclitaxel y un complejo de platino tal como carboplatino. En otras realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en combinación con un antimetabolito tal como gemcitabina y un complejo de platino tal como carboplatino. En otras realizaciones más, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama metastásicos en combinación con un taxano tal como paclitaxel y un complejo de platino tal como carboplatino. En otras realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en combinación con un agente anti-angiogénico. En otras realizaciones más, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en combinación con un inhibidor de topoisomerasa tal como irinotecán o topotecán. En otras realizaciones, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en combinación con terapia hormonal. En otras realizaciones más, BA puede usarse en el tratamiento de tumores de mama en combinación con un inhibidor de un receptor de factor de crecimiento incluyendo pero sin limitarse a inhibidor de EGFR o IGF1R. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama metastásico triple negativo. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de ER, PR o Her-2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos dos de ER, PR o Her-2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos uno de ER, PR, o Her-2, y positivo para al menos uno de ER, PR, o Her-2. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es negativo para al menos dos de ER, PR, o Her2, p. ej. ER-negativo, PR-negativo, y Her-2 positivo; o ER-positivo, PR-negativo, y Her-2 negativo; o ER-negativo, PR-positivo, y Her-2 negativo.

[00111] La dosificación del inhibidor de PARP puede variar dependiendo de la edad, altura, peso, salud general, etc del paciente. En algunas realizaciones, la dosificación de BA está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35

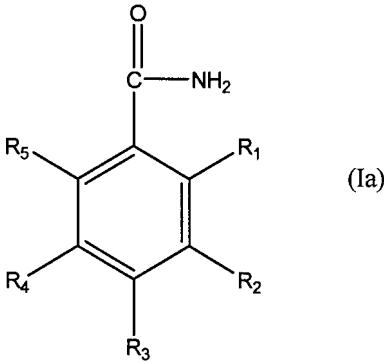
mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 2 a aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 4 a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 4 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg/kg o aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mg/kg. BA puede administrarse por vía intravenosa, p. ej. infusión IV durante aproximadamente 10 a aproximadamente 300 minutos, aproximadamente 30 a aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 45 a aproximadamente 120 minutos o aproximadamente 60 minutos (es decir aproximadamente 1 hora). En algunas realizaciones, BA puede administrarse alternativamente por vía oral. En este contexto, el término “aproximadamente” tiene su significado normal de aproximadamente. En algunas realizaciones, aproximadamente significa $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$.

[00112] La síntesis de BA (4-yodo-3-nitrobenzamida) se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5.464.871, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. BA puede prepararse en concentraciones de 10 mg/mL y puede envasarse en una forma conveniente, p. ej. en viales de 10 mL.

Metabolitos de BA:

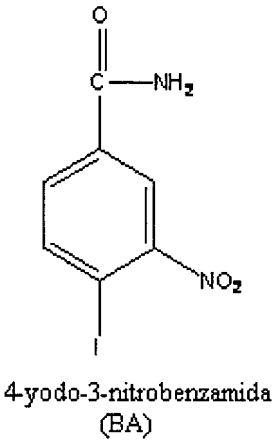
[00113] Tal y como se usa en la presente memoria “BA” significa 4-yodo-3-nitrobenzamida; “BNO” significa 4-yodo-3-nitrosobenzamida; “BNHOH” significa 4-yodo-3-hidroxiaminobenzamida.

[00114] Los compuestos precursores útiles en la presente invención son los de Fórmula (Ia)

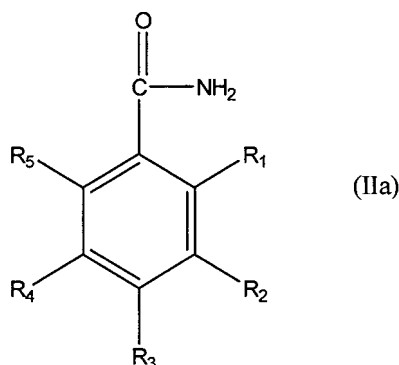


en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, amino, nitro, yodo, alquilo (C_1 - C_6), alcoxi (C_1 - C_6), cicloalquilo (C_3 - C_7) y fenilo, en la que al menos dos de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son siempre hidrógeno, al menos uno de los cinco sustituyentes es siempre nitro, y al menos un sustituyente situado adyacente a un nitro es siempre yodo, y sales, solvatos, isómeros, tautómeros, metabolitos, análogos o pro-fármacos farmacéuticamente aceptables de éste. R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 también pueden ser un haluro tal como sustituyentes cloro, flúor o bromo.

[00115] Un compuesto precursor preferido de fórmula Ia es:

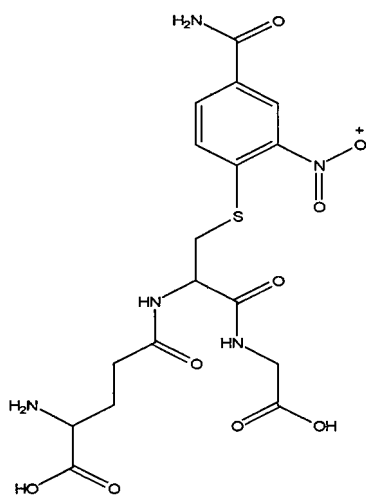


[00116] Algunos metabolitos útiles en la presente invención son los de Fórmula (IIa):

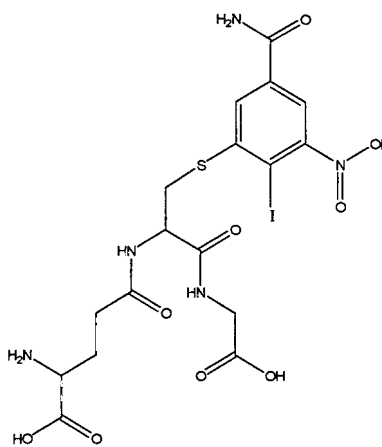


en la que bien: (1) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre un sustituyente que contiene azufre, y los sustituyentes restantes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, amino, nitro, yodo, bromo, flúor, cloro, alquilo ($C_1 - C_6$), alcoxi ($C_1 - C_6$), cicloalquilo ($C_3 - C_7$), y fenilo, en la que al menos dos de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 son siempre hidrógeno; o (2) al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 no es un sustituyente que contiene azufre y al menos uno de los cinco sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , y R_5 es siempre yodo, y en la que dicho yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , o R_5 que es bien un grupo nitro, nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino; y sales solvatos, isómeros, tautómeros, metabolitos, análogos, o profármacos farmacéuticamente aceptables de éste. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, hidroxilo o amino. En algunas realizaciones, los compuestos de (2) son tales que el grupo yodo es siempre adyacente a un grupo R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 que es un grupo nitroso, hidroxiamino, o amino.

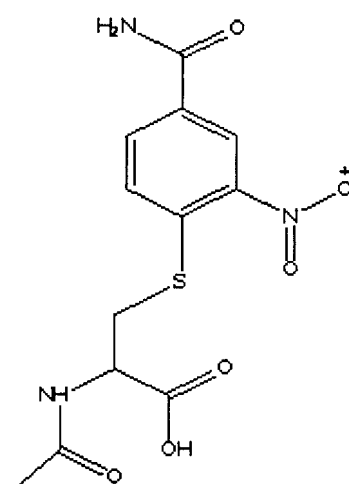
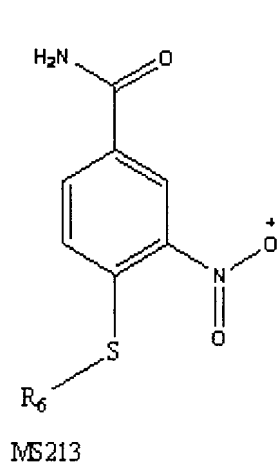
[00117] Las composiciones siguientes son compuestos metabolitos preferidos, representado cada uno por una fórmula química:



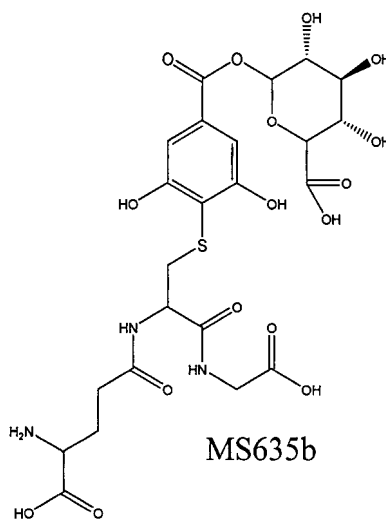
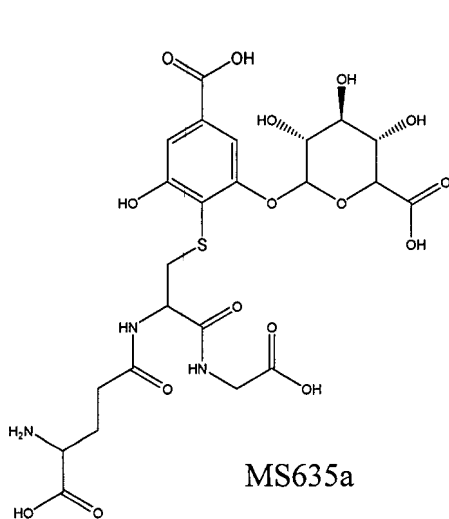
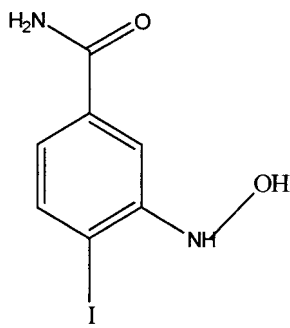
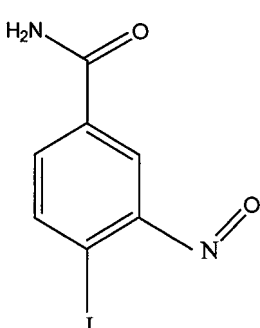
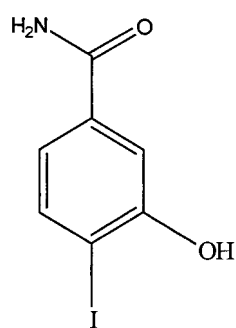
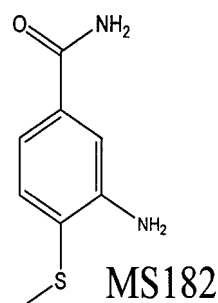
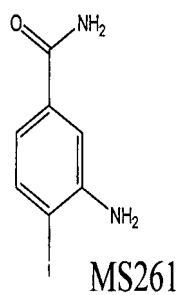
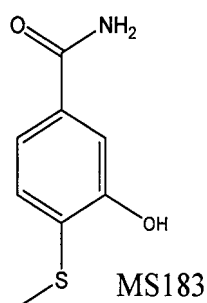
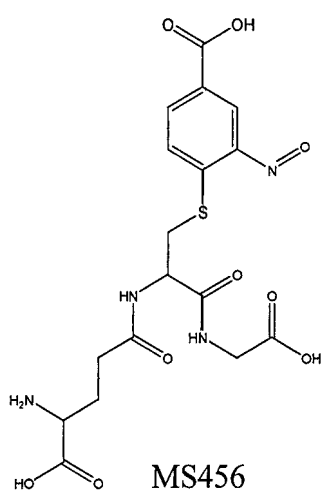
MS472

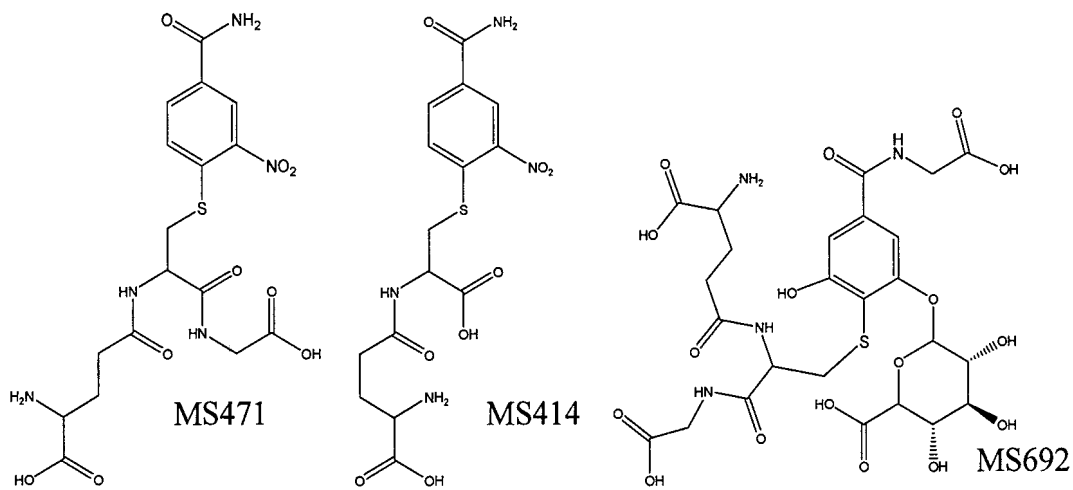


MS601



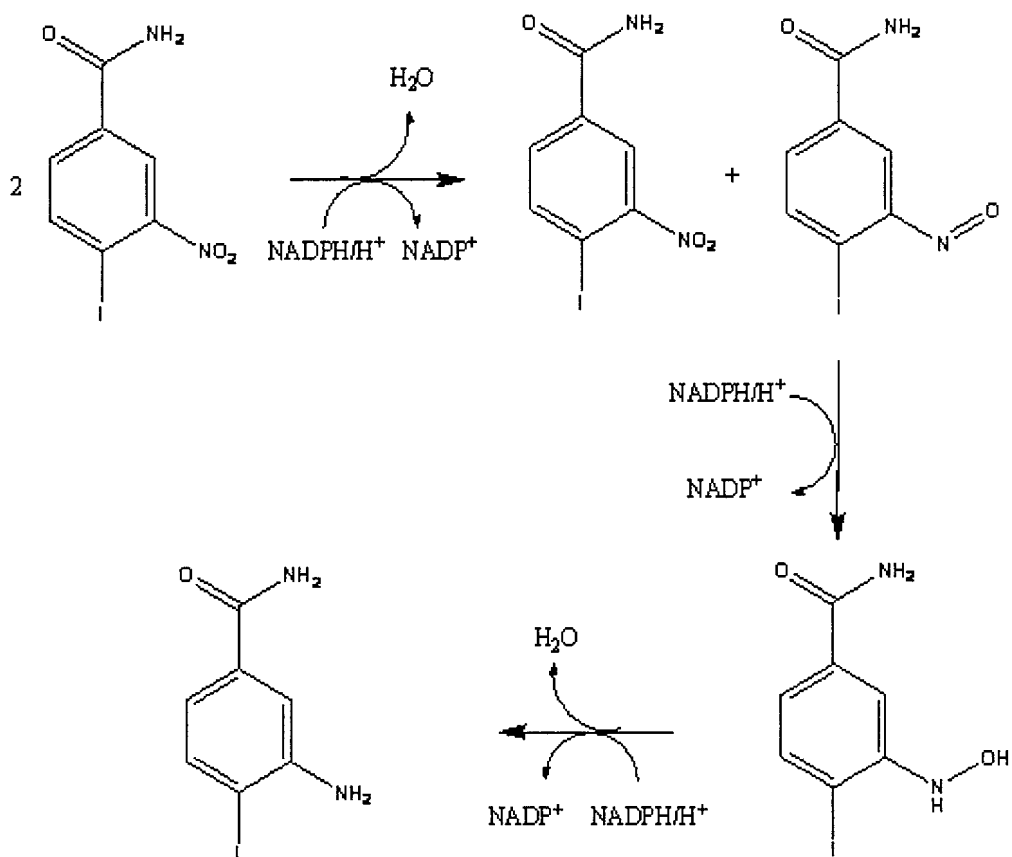
R₆ se selecciona de un grupo que consiste en hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), alcoxi (C₁-C₈), isoquinolinonas, indoles, tiazol, oxazol, oxadiazol, tífeno, o fenilo.





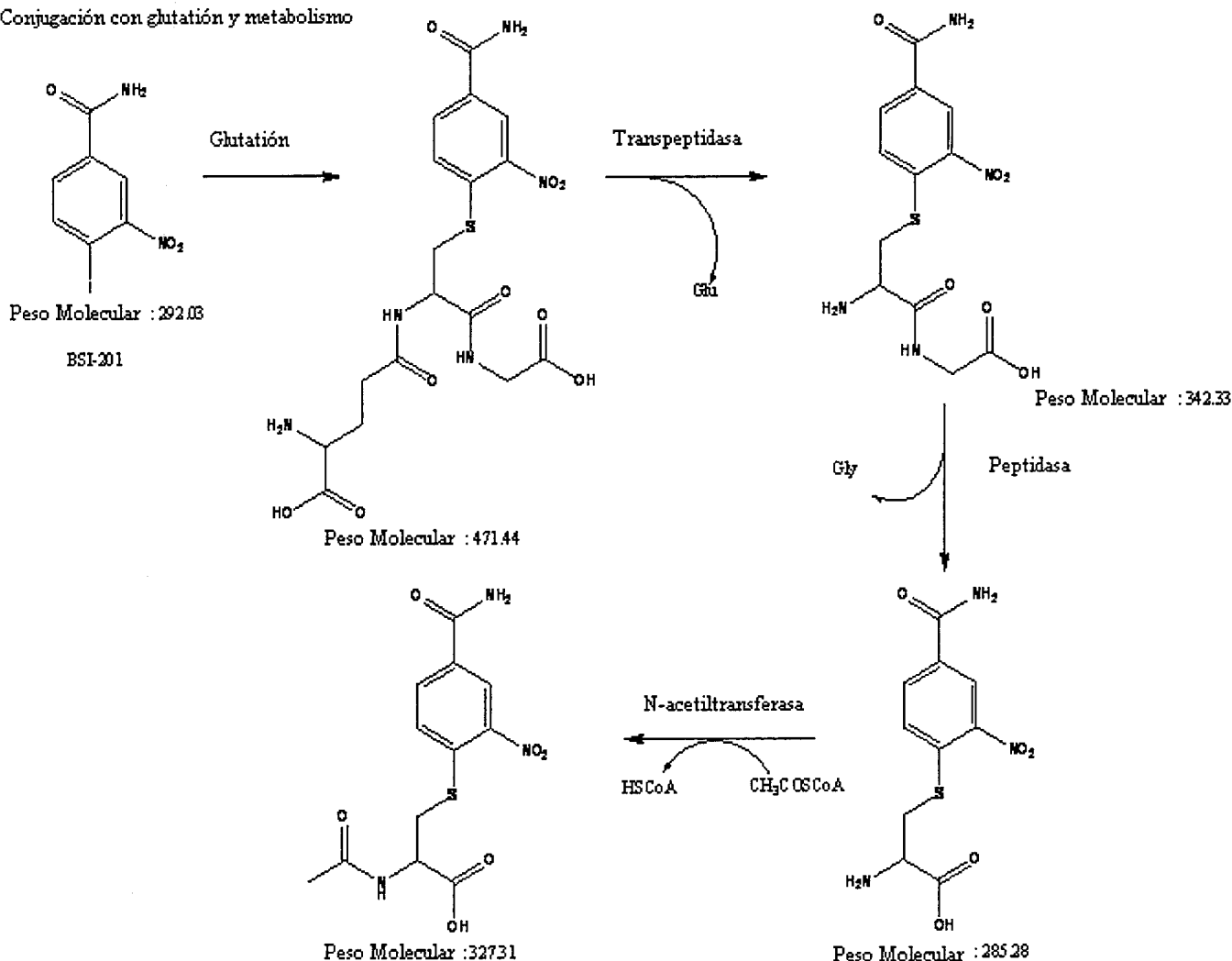
[00118] Aunque no está limitado a ningún mecanismo particular, lo siguiente proporciona un ejemplo de metabolismo para MS292 a través de un mecanismo de conjugación con nitrorreductasa o glutatión:

Mecanismo nitrorreductasa



[00119] Conjugación con glutatión y metabolismo de BA:

Conjugación con glutatión y metabolismo



[00120] La presente invención proporciona el uso de los compuestos metabolitos nitrobenzamida mencionados anteriormente para el tratamiento de cánceres de mama, incluyendo los cánceres de mama que son negativos para uno o más de ER, PR y/o HER2

[00121] Se ha publicado que los compuestos metabolitos nitrobenzamida tiene citotoxicidad selectiva sobre células cancerosas malignas pero no sobre células cancerosas no malignas. Véase Rice et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7703-7707 (1992), incorporado en la presente memoria en su totalidad. En una realización, los compuestos metabolitos nitrobenzamida utilizados en los métodos de la presente invención pueden presentar más toxicidad selectiva frente a células tumorales que células no tumorales.

[00122] En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para tratar cáncer de mama que es negativo para al menos uno de ER, PR, o Her2, administrando a un sujeto que lo necesite al menos un inhibidor de PARP. En otras realizaciones, la invención proporciona un método para tratar cáncer de mama administrando a un sujeto que lo necesite al menos un inhibidor de PARP y al menos un agente anti-tumoral. En algunas realizaciones, los metabolitos según la invención se administran a un paciente que necesite dicho tratamiento conjuntamente con quimioterapia con al menos un antimetabolito (p. ej. una de las citabinas, tal como gemcitabina) y al menos un complejo de platino (p. ej. carboplatino, cisplatino, etc.). En otras realizaciones, los metabolitos según la invención se administran así a un paciente que necesite dicho tratamiento conjuntamente con quimioterapia con al menos un taxano (p. ej. paclitaxel o docetaxel) además de al menos un complejo de platino (p. ej. carboplatino, cisplatino, etc.). El intervalo de dosificación para dichos metabolitos puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,0004 a aproximadamente 0,5 mmol/kg (milimoles de metabolito por kilogramo de peso corporal del paciente), dosificación que corresponde, en base molar, a un intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg de BA. Otros intervalos

eficaces de dosificaciones para los metabolitos son 0,0024-0,5 mmol/kg y 0,0048-0,25 mmol/kg. Dichas dosis pueden administrarse de manera diaria, diaria alterna, dos veces a la semana, semanal, cada dos semanas, mensual o según otro programa adecuado. Esencialmente, pueden emplearse los mismos modos de administración para los metabolitos que para BA—p. ej. oral, i.v., i.p., etc.

Taxanos:

[00123] Los taxanos son fármacos que se obtienen de las ramas jóvenes, agujas y corteza de los tejos del Pacífico, *Taxus brevifolia*. En particular, paclitaxel puede obtenerse de 10-deacetilbaccatina a través de métodos sintéticos conocidos. Los taxanos tales como paclitaxel y su derivado docetaxel han demostrado actividad antitumoral en una variedad de tipos de tumores. Los taxanos interfieren con la función normal del crecimiento de los microtúbulos por hiperestabilización de su estructura, destruyendo de esta manera la capacidad de las células para usar su citoesqueleto de una manera normal. Específicamente, los taxanos se unen a la subunidad β de la tubulina, que es el bloque básico de los microtúbulos. El complejo taxano/tubulina resultante no puede desensamblarse, lo que resulta en una función celular aberrante y la eventual muerte celular. El paclitaxel induce la muerte celular programada (apoptosis) en células cancerosas uniéndose a una proteína que inhibe la apoptosis denominada Bcl-2 (leucemia de células B 2), evitando de esta manera que Bcl-2 inhiba la apoptosis. Así, se ha probado que el paclitaxel es un tratamiento eficaz para varios cánceres, ya que regula a la baja la división celular interrumpiendo la reorganización normal del citoesqueleto durante la división celular e induce la apoptosis a través del mecanismo anti-Bcl-2.

[00124] La dosificación de paclitaxel puede variar dependiendo de la altura, peso, condición física, tamaño del tumor y estado de progresión, etc. En algunas realizaciones, la dosificación de paclitaxel estará en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.500 mg/m², aproximadamente 200 a aproximadamente 1.250 mg/m², aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000 mg/m², aproximadamente 700 a 800 mg/m² o aproximadamente 750 mg/m² de paclitaxel administrado durante un periodo de hasta aproximadamente 10 horas, hasta aproximadamente 8 horas o hasta aproximadamente 6 horas. El término “aproximadamente” en este contexto indica el uso normal de aproximadamente; y en algunas realizaciones indica una tolerancia de $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$.

[00125] Los ejemplos de taxanos incluyen pero no están limitados a docetaxel, paclitaxel, y Abraxano.

Terapia de Combinación

[00126] En determinadas realizaciones de la presente invención, los métodos de la invención comprenden además tratar cáncer de mama mediante la administración a un sujeto de un inhibidor de PARP con o sin al menos un agente anti-tumoral en combinación con otra terapia anti-cancerosa incluyendo pero sin limitarse a cirugía, terapia de radiación (p. ej. rayos X), terapia génica, inmunoterapia, terapia de ADN, terapia adyuvante, terapia neoadyuvante, terapia viral, terapia de ARN, o nanoterapia.

[00127] Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento sin fármacos, el tratamiento sin fármacos puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se consiga un efecto beneficioso de la co-acción de la combinación de los agentes terapéuticos y del tratamiento sin fármacos. Por ejemplo, en los casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se consigue cuando el tratamiento sin fármacos se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, durante un periodo significativo de tiempo. El conjugado y el otro agente farmacológicamente activo pueden administrarse a un paciente simultáneamente, secuencialmente o en combinación. Se apreciará que cuando se usa una combinación de la invención, el compuesto de la invención y el otro agente farmacológicamente activo pueden estar en el mismo vehículo farmacéuticamente aceptable y, por lo tanto, administrarse simultáneamente. Pueden estar en vehículos farmacéuticos distintos tales como formas de dosificación orales convencionales que se toman

simultáneamente. El término "combinación" se refiere además al caso en el que los compuestos se proporcionan en formas de dosificación distintas y se administran secuencialmente.

Terapia de Radiación

[00128] La terapia de radiación (o radioterapia) es el uso médico de radiación ionizante como parte del tratamiento del cáncer para controlar las células malignas. La radioterapia puede usarse para el tratamiento del cáncer curativo o adyuvante. Se usa como tratamiento paliativo (cuando la cura no es posible y el objetivo es para el control local de la enfermedad o el alivio sintomático) o como tratamiento terapéutico (en el que la terapia tiene un beneficio de supervivencia y puede ser curativa). La radioterapia se usa para el tratamiento de tumores malignos y puede usarse como la terapia primaria. También es común combinar radioterapia con cirugía, quimioterapia, terapia hormonal o alguna mezcla de las tres. Los tipos de cáncer más comunes pueden tratarse con radioterapia de alguna manera. El intento de tratamiento preciso (curativo, adyuvante, neoadyuvante, terapéutico, o paliativo) dependerá del tipo, localización, y estadio del tumor, así como del estado general de salud del paciente.

[00129] La terapia de radiación se aplica comúnmente al tumor canceroso. Los campos de radiación también pueden incluir los nódulos linfáticos drenantes si están clínicamente o radiológicamente implicados en el tumor, o si se piensa que hay un riesgo de diseminación maligna subclínica. Es necesario incluir un margen de tejido normal alrededor del tumor para tener en cuenta las incertidumbres en el programa diario y el movimiento del tumor interno.

[00130] La terapia de radiación funciona dañando el ADN de las células. El daño es causado por un haz de fotones, electrones, protones, neutrones, o iones que ioniza directamente o indirectamente los átomos que fabrican la cadena de ADN. La ionización indirecta ocurre como resultado de la ionización del agua, formando radicales libres, principalmente radicales hidroxilo, que dañan el ADN. En las formas más comunes de terapia de radiación, la mayoría del efecto de la radiación es a través de radicales libres. Debido a que las células tienen mecanismos para reparar el daño del ADN, la rotura del ADN en ambas cadenas ha mostrado ser la técnica más significativa para modificar las características celulares. Debido a que las células cancerosas son generalmente no diferenciadas y semejantes a células madre, se reproducen más, y tienen una capacidad disminuida para reparar un daño subletal comparadas con la mayoría de las células diferenciadas sanas. El daño en el ADN se hereda a través de la división celular, acumulándose el daño en las células cancerosas, lo que les causa la muerte o que se reproduzcan más despacio. La radioterapia de protones funciona enviando protones con una energía cinética variada para parar de manera precisa en el tumor.

[00131] Los rayos gamma también se usan para tratar algunos tipos de cánceres incluyendo el cáncer de mama. En el procedimiento denominado cirugía con bisturí de rayos gamma ("gamma-knife"), se dirigen múltiples haces de rayos gamma concentrados al crecimiento con el fin de matar las células cancerosas. Los haces se dirigen desde distintos ángulos para focalizar la radiación en el crecimiento mientras se minimiza el daño a los tejidos circundantes.

[00132] En algunas realizaciones, la irradiación gamma se usa para tratar cáncer de mama triple negativo y se ejemplifica en el Ejemplo 9.

Agentes de Terapia Génica

[00133] Los agentes de terapia génica insertan copias de genes en un conjunto específico de células de un paciente, y pueden estar dirigidos tanto a células cancerosas como no cancerosas. El objetivo de la terapia

génica puede ser reemplazar genes alterados con genes funcionales, estimular la respuesta inmune de un paciente al cáncer, hacer que las células cancerosas sean más sensibles a la quimioterapia, poner genes “suicidas” en las células cancerosas, o inhibir la angiogénesis. Los genes pueden administrarse a las células diana usando virus, liposomas, u otros vehículos o vectores. Esto puede hacerse inyectando la composición que contiene el gen en el paciente directamente, o *ex vivo*, introduciéndose células infectadas de nuevo en un paciente. Dichas composiciones son adecuadas para usarse en la presente invención.

Terapia adyuvante

[00134] La terapia adyuvante es un tratamiento proporcionado después del tratamiento primario para incrementar las posibilidades de una cura. La terapia adyuvante puede incluir quimioterapia, terapia de radiación, terapia hormonal, o terapia biológica.

[00135] Debido a que el propósito principal de la terapia adyuvante es matar cualquier célula cancerosa que pueda haberse diseminado, el tratamiento es habitualmente sistémico (usa sustancias que viajan a través del torrente sanguíneo, alcanzando y afectando las células cancerosas por todo el cuerpo). La terapia adyuvante para el cáncer de mama implica quimioterapia o terapia hormonal, bien solas o en combinación:

[00136] La quimioterapia adyuvante es el uso de fármacos para matar células cancerosas. La investigación ha mostrado que el uso de quimioterapia como terapia adyuvante para el cáncer de mama en estadio temprano ayuda a evitar la vuelta del cáncer original. La quimioterapia adyuvante es habitualmente una combinación de fármacos anticancerosos, que se ha mostrado que es más eficaz que un único fármaco anticanceroso.

[00137] La terapia hormonal adyuvante priva a las células cancerosas de la hormona femenina estrógeno, que algunas células de cáncer de mama necesitan para crecer. Lo más habitual es que la terapia hormonal adyuvante sea tratamiento con el fármaco tamoxifeno. La investigación ha mostrado que cuando el tamoxifeno se usa como terapia adyuvante para cáncer de mama en estadio temprano, ayuda a evitar la vuelta del cáncer original y también ayuda a evitar el desarrollo de nuevos cánceres en la otra mama.

[00138] Los ovarios son la fuente principal de estrógeno antes de la menopausia. Para las mujeres premenopáusicas con cáncer de mama, la terapia hormonal adyuvante puede implicar tamoxifeno para privar a las células cancerosas de estrógeno. Se están investigando los fármacos para suprimir la producción de estrógeno por los ovarios. Alternativamente, puede realizarse cirugía para eliminar los ovarios.

[00139] La terapia de radiación se usa a veces como un tratamiento adyuvante local. La terapia de radiación se considera tratamiento adyuvante cuando se proporciona antes o después de una mastectomía. Se pretende que dicho tratamiento destruya las células de cáncer de mama que se han diseminado a partes cercanas del cuerpo, tales como la pared torácica o los nódulos linfáticos. La terapia de radiación es parte de terapia primaria, no terapia adyuvante, cuando sigue a una cirugía de conservación de la mama.

Terapia neoadyuvante

[00140] La terapia neoadyuvante se refiere a un tratamiento que se proporciona antes del tratamiento primario. Los ejemplos de terapia neoadyuvante incluyen quimioterapia, terapia de radiación, y terapia hormonal. En el tratamiento del cáncer de mama, la terapia neoadyuvante permite a los pacientes con cáncer de mama extenso someterse a cirugía de conservación de la mama.

Terapia viral oncolítica

[00141] La terapia viral para el cáncer utiliza un tipo de virus denominados virus oncolíticos. Un virus oncolítico es un virus que es capaz de infectar y lisar las células cancerosas, a la vez que deja a las células normales sin daño, lo que les hace potencialmente útiles en la terapia del cáncer. La replicación de los virus oncolíticos facilita la destrucción de las células tumorales y también produce la amplificación de la dosis en el sitio del tumor. También pueden actuar como vectores para genes anticancerosos, permitiendo su administración específicamente en el sitio del tumor.

[00142] Hay dos métodos principales para generar selectividad tumoral: direccionamiento transduccional y no transduccional. El direccionamiento transduccional implica modificar la especificidad de la proteína de la envuelta viral, incrementando así la entrada en las células diana mientras se reduce la entrada en las células no diana. El direccionamiento no transduccional implica alterar el genoma del virus de manera que sólo puede replicarse en las células cancerosas. Esto puede hacerse por direccionamiento transcripcional, en el que los genes esenciales para la replicación viral se ponen bajo el control de un promotor específico de tumores, o por atenuación, que implica introducir delecciones en el genoma viral que eliminan funciones que son prescindibles en las células cancerosas, pero no en las células normales. También hay otros métodos ligeramente más desconocidos.

[00143] *Chen et al (2001)* usaron CV706, un adenovirus específico de la próstata, junto con radioterapia en cáncer de próstata en ratones. El tratamiento combinado resulta en un incremento sinérgico de la muerte celular, así como un incremento significativo del tamaño del estallido viral (el número de partículas de virus liberado a partir de cada lisis celular).

[00144] ONYX-015 se ha sometido a ensayos junto con quimioterapia. El tratamiento combinado proporciona una mayor respuesta que cada tratamiento solo, pero los resultados no han sido totalmente concluyentes. ONYX-015 se ha mostrado prometedor junto con radioterapia.

[00145] Los agentes virales administrados por vía intravenosa pueden ser particularmente eficaces frente a cánceres metastásicos, que son especialmente difíciles de tratar convencionalmente. Sin embargo, los virus transmitidos por la sangre pueden ser desactivados por anticuerpos y aclarados de la corriente sanguínea muy deprisa p. ej. por células Kupffer (células fagocíticas del hígado extremadamente activas, que son responsables del aclaramiento de adenovirus). La acción de eludir el sistema inmune hasta que el tumor se ha destruido podría ser el mayor obstáculo para el éxito de la terapia con virus oncolíticos. Hasta la fecha, no es completamente satisfactoria ninguna técnica usada para eludir el sistema inmune. Conjuntamente con terapias de cáncer convencionales es cuando los virus oncolíticos se muestran los más prometedores, ya que las terapias combinadas operan de manera sinérgica sin efectos negativos aparentes.

[00146] La especificidad y flexibilidad de los virus oncolíticos significa que tienen el potencial de tratar un rango amplio de cánceres incluyendo cáncer de mama con efectos secundarios mínimos. Los virus oncolíticos tienen el potencial de resolver el problema de matar selectivamente las células cancerosas.

[00147]

Nanoterapia

[00148] Las partículas de tamaño nanométrico tienen nuevas propiedades ópticas, electrónicas y estructurales que no están disponibles para moléculas individuales o sólidos a granel. Cuando se unen con restos dirigidos a tumores, tales como ligandos específicos de tumores o anticuerpos monoclonales, estas nanopartículas pueden usarse para establecer como objetivo receptores específicos de cáncer, antígenos tumorales (biomarcadores) y vasculaturas tumorales con alta afinidad y precisión. La formación y el proceso de fabricación para la nanoterapia del cáncer se describen en la patente de EEUU 7179484, y el artículo M. N. Khalid, P. Simard, D. Hoarau, A. Dragomir, J. Leroux, Long Circulating Poly(Ethylene Glycol)Decorated Lipid Nanocapsules Deliver Docetaxel to Solid Tumors, *Pharmaceutical Research*, 23(4), 2006, incorporándose todos ellos en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Terapia de ARN

[00149] El ARN, incluyendo pero sin limitarse a ARNsi, ARNsh o ARNmico, puede usarse para modular la expresión génica y para tratar cánceres. Los oligonucleótidos de doble cadena se forman mediante el ensamblaje de dos secuencias oligonucleotídicas distintas en las que la secuencia oligonucleotídica de una cadena es complementaria a la secuencia oligonucleotídica de la segunda cadena; dichos oligonucleótidos de

doble cadena se ensamblan generalmente a partir de dos oligonucleótidos distintos (p. ej., ARNsi), o a partir de una única molécula que se pliega sobre sí misma para formar una estructura de doble cadena (p. ej., ARNsh o ARN en forma de horquilla corta). Estos oligonucleótidos de doble cadena conocidos en la técnica tienen todos una característica común en que cada cadena del dúplex tiene una secuencia nucleotídica distinta, en la que sólo una región de la secuencia nucleotídica (secuencia guía o la secuencia antisentido) tiene complementaridad respecto a una secuencia de ácido nucleico diana y la otra cadena (secuencia con sentido) comprende una secuencia nucleotídica que es homóloga a la secuencia de ácido nucleico diana.

[00150] Los microARN (ARNmi) son moléculas de ARN de cadena sencilla de aproximadamente 21–23 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica. Los ARNmi están codificados por genes que se transcriben a partir de ADN pero que no se traducen en proteína (ARN no codificador); en vez de esto, se procesan a partir de transcritos primarios conocidos como pri-ARNmi a estructuras en horquilla cortas denominadas pre-ARNmi y finalmente a ARNmi funcional. Las moléculas de ARNmi maduras son parcialmente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm), y su función principal es regular a la baja la expresión génica.

[00151] Determinados agentes inhibidores de ARN pueden utilizarse para inhibir la expresión o traducción de ARN mensajero (“ARNm”) que está asociado con un fenotipo de cáncer. Los ejemplos de dichos agentes adecuados para usarse en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, ARN de interferencia corto (“ARNsi”), ribozimas, y oligonucleótidos antisentido. Los ejemplos específicos de agentes inhibidores de ARN adecuados para usarse en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, Cand5, Sirna-027, fomivirsen, y angiozima.

Moléculas Pequeñas Como Inhibidores Enzimáticos

[00152] Determinados agentes terapéuticos que son moléculas pequeñas pueden tener como objetivo la actividad enzimática tirosina quinasa o las señales de transducción de la señal posteriores de determinados receptores celulares tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (“EGFR”) o el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (“VEGFR”). Dicho direccionamiento por terapéuticos que son moléculas pequeñas puede resultar en efectos anti-cancerosos. Los ejemplos de dichos agentes adecuados para usarse en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, imatinib, gefitinib, erlotinib, lapatinib, canertinib, ZD6474, sorafenib (BAY 43-9006), ERB-569, y sus análogos y derivados.

Agentes Anti-Metastásicos

[00153] El proceso por el que las células cancerosas se diseminan desde el sitio del tumor original a otras localizaciones en el cuerpo se denomina metástasis cancerosa. Determinados agentes tienen propiedades anti-metastásicas, diseñadas para inhibir la diseminación de las células cancerosas. Los ejemplos de dichos agentes adecuados para usarse en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, marimastat, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, erlotinib, MMI-166, GRN163L, péptidos de búsqueda y eliminación, inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP), sus análogos, derivados y variantes.

Agentes quimiopreventivos

[00154] Determinados agentes farmacéuticos pueden usarse para prevenir las incidencias iniciales del cáncer, o para prevenir la recurrencia o metástasis. La administración con dichos agentes quimiopreventivos en combinación con conjugados eflornitina-NSAID de la invención puede actuar tanto para tratar como para prevenir la recurrencia del cáncer. Los ejemplos de agentes quimiopreventivos adecuados para usarse en la presente memoria incluyen, pero no están limitados a, tamoxifeno, raloxifeno, tibolona, bisfosfonato, ibandronato, moduladores del receptor de estrógeno, inhibidores de aromataza (letrozol, anastrozol), agonistas de la hormona de liberación de la hormona luteinizante, goserelina, vitamina A, retinal, ácido retinoico,

fenretinida, ácido 9-*cis*-retinoide, ácido 13-*cis*-retinoide, ácido todo-*trans*-retinoico, isotretinoína, tretinoid, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, inhibidores de ciclooxigenasa, fármacos anti-inflamatorios no-esteroides (NSAID), aspirina, ibuprofeno, celecoxib, polifenoles, polifenol E, extracto de té verde, ácido fólico, ácido glucárico, interferón-alfa, anetol ditioleona, cinc, piridoxina, finasterida, doxazosina, selenio, indol-3-carbinal, alfa-difluorometilornitina, carotenoides, beta-caroteno, licopeno, antioxidantes, coenzima Q10, flavonoides, quercetina, curcumina, catequinas, galato de epigallocatequina, N-acetilcisteína, indol-3-carbinol, inositol hexafosfato, isoflavonas, ácido glucánico, romero, soja, sabal, y calcio. Un ejemplo adicional de agentes quimiopreventivos adecuados para usarse en la presente invención es vacunas contra el cáncer. Éstas pueden crearse a través de la inmunización de un paciente con todo o parte de un tipo celular canceroso que se establece como diana del proceso de vacunación.

Eficacia Clínica:

Estadificación del cáncer de mama:

[00155] El estadio 0 se usa para describir cánceres de mama no invasivos, tales como DCIS y LCIS. En el estadio 0, no hay evidencia de células cancerosas o células no cancerosas anormales que hayan salido de la parte de la mama en la que empezaron, o de que hayan llegado a o invadido tejido normal circundante.

[00156] El estadio I describe cáncer de mama invasivo (las células cancerosas se han escapado a o han invadido el tejido normal circundante) en el que el tumor mide hasta 2 centímetros, y no están implicados nódulos linfáticos.

[00157] El estadio II se divide en subcategorías conocidas como IIA y IIB. El estadio IIA describe cáncer de mama invasivo en el que no se encuentra ningún tumor en la mama, pero las células cancerosas se encuentran en los nódulos linfáticos axilares (los nódulos linfáticos situados debajo del brazo), o el tumor mide 2 centímetros o menos y se ha diseminado a los nódulos linfáticos axilares, o el tumor es mayor de 2 centímetros pero no mayor de 5 centímetros y no se ha diseminado a los nódulos linfáticos axilares. El estadio IIB describe cáncer de mama invasivo en el que: el tumor es mayor de 2 pero no mayor de 5 centímetros y se ha diseminado a los nódulos linfáticos axilares, o el tumor es mayor de 5 centímetros pero no se ha diseminado a los nódulos linfáticos axilares.

[00158] El estadio III se divide en subcategorías conocidas como IIIA, IIIB, y IIIC. El estadio IIIA describe cáncer de mama invasivo en el que no se encuentra tumor en la mama. El cáncer se encuentra en los nódulos linfáticos axilares que están agrupados entre sí o pegados a otras estructuras, o el cáncer puede haberse diseminado a los nódulos linfáticos cercanos al esternón, o el tumor tiene 5 centímetros o menos y se ha diseminado a los nódulos linfáticos axilares que están agrupados entre sí o pegados a otras estructuras, o el tumor es mayor de 5 centímetros y se ha diseminado a los nódulos linfáticos axilares que están agrupados entre sí o pegados a otras estructuras. El estadio IIIB describe cáncer de mama invasivo en el que el tumor puede tener cualquier tamaño y se ha diseminado a la pared torácica y/o piel de la mama y puede haberse diseminado a los nódulos linfáticos axilares que están agrupados entre sí o pegados a otras estructuras, o el cáncer puede haberse diseminado a los nódulos linfáticos cercanos al esternón. El estadio IIIC describe cáncer de mama invasivo en el que puede no haber signos de cáncer en la mama o, si hay un tumor, puede tener cualquier tamaño y puede haberse diseminado a la pared torácica y/o la piel de la mama, y el cáncer se ha diseminado a los nódulos linfáticos que están por debajo o por encima de la clavícula, y el cáncer puede haberse diseminado a los nódulos linfáticos axilares o a los nódulos linfáticos cercanos al esternón.

[00159] La eficacia clínica puede medirse por cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la eficacia clínica de los tratamientos terapéuticos descritos en la presente memoria puede determinarse midiendo la tasa de beneficio clínico (CBR). La tasa de beneficio clínico se mide determinando

la suma del porcentaje de pacientes que están en remisión completa (CR), el número de pacientes que están en remisión parcial (PR) y el número de pacientes que tienen una enfermedad estable (SD) en un punto de tiempo al menos 6 meses después del final de la terapia. La forma abreviada para esta fórmula es $CBR = CR + PR + SD \geq 6 \text{ meses}$. La CBR para la terapia de combinación con gemcitabina y carboplatino es 45%. Así, la CBR para la terapia de combinación triple con un antimetabolito, complejo de platino e inhibidor de PARP (p. ej. gemcitabina, carboplatino y BA; CBR_{GCB}) puede compararse con la de la terapia de combinación doble con gemcitabina y carboplatino (CBR_{GC}). En algunas realizaciones, CBR_{GCB} es al menos aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, CBR es al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50%. La CBR para la terapia de combinación con paclitaxel y carboplatino es 45%. Así, la CBR para la terapia de combinación triple con un taxano, complejo de platino e inhibidor de PARP (p. ej. paclitaxel, carboplatino y BA; CBR_{GCB}) puede compararse con la de la terapia de combinación doble con paclitaxel y carboplatino (CBR_{GC}). En algunas realizaciones, CBR_{GCB} es al menos aproximadamente 60%.

[00160] En algunas realizaciones, CBR es al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50%. En algunas realizaciones, el efecto terapéutico incluye la reducción del tamaño de un tumor de mama, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable, o una respuesta patológica completa.

[00161] La quimioterapia neoadyuvante se usa actualmente de forma amplia en el tratamiento de cánceres de mama extensos avanzados localmente o potencialmente operables. Los ensayos aleatorizados han demostrado que la quimioterapia neoadyuvante reduce la necesidad de mastectomía (Powles *et al*, 1995; Fisher *et al*, 1998), con tasas de supervivencia globales similares a la quimioterapia adyuvante (Fisher *et al*, 1998). Las mujeres que logran una ausencia de evidencia histológica residual del tumor después de la quimioterapia en el momento de la cirugía (es decir, una respuesta patológica completa (pCR)) tienen una supervivencia significativamente mejorada (Bonadonna *et al*, 1998; Fisher *et al*, 1998; Kuerer *et al*, 1999), y pCR se usa a menudo como un marcador sucedáneo temprano de la eficacia del tratamiento. Sin embargo, no existe un método estándar para clasificar la respuesta patológica de los tumores de mama a la quimioterapia neoadyuvante y se han propuesto varios sistemas de clasificación diferentes (Chevallier *et al*, 1993; Sataloff *et al*, 1995; Fisher *et al*, 1997; Honkoop *et al*, 1998; Kuerer *et al*, 1998; Ogston *et al*, 2003). La mayoría, pero no todos, de estos sistemas de gradación han incluido tanto enfermedad no residual de cualquier clase como carcinoma ductal residual *in situ* (DCIS) sin enfermedad invasiva en la definición de pCR.

[00162] En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, los métodos incluyen la predeterminación de que un cáncer es tratable con moduladores de PARP. Algunos de dichos métodos comprenden identificar un nivel de PARP en una muestra de cáncer de mama de un paciente, determinar si el nivel de la expresión de PARP en la muestra es mayor que un valor predeterminado, y, si la expresión de PARP es mayor que dicho valor predeterminado, tratar al paciente con una combinación de un taxano (p. ej. paclitaxel), un complejo de platino (p. ej. carboplatino) y un inhibidor de PARP tal como BA. En otras realizaciones, el método comprende identificar un nivel de PARP en una muestra de cáncer de mama de un paciente, determinar si el nivel de la expresión de PARP en la muestra es mayor que un valor predeterminado, y, si la expresión de PARP es mayor que dicho valor predeterminado, tratar al paciente con un inhibidor de PARP tal como BA. En otras realizaciones, los métodos incluyen predeterminar que un cáncer es tratable con moduladores de PARP. Algunos de dichos métodos comprenden identificar un nivel de PARP en una muestra de cáncer de mama de un paciente, determinar si el nivel de expresión de PARP en la muestra es mayor que un valor predeterminado, y, si la expresión de PARP es mayor que dicho valor predeterminado, tratar al paciente con

una combinación de un antimetabolito (p. ej. gemcitabina), un complejo de platino (p. ej. carboplatino) y un inhibidor de PARP tal como BA.

[00163] Los tumores de mama en mujeres con defectos heredados en los genes BRCA1 o BRCA2 ocurren porque las células tumorales han perdido un mecanismo específico que repara el ADN dañado. BRCA1 y BRCA2 son importantes para la reparación de roturas en ADN de doble cadena por recombinación homóloga, y las mutaciones en estos genes predisponen a cánceres de mama y otros cánceres. PARP está implicada en la reparación por escisión de bases, una vía en la reparación de roturas de ADN de cadena sencilla. La disfunción de BRCA1 o BRCA2 sensibiliza a las células frente a la inhibición de la actividad enzimática de PARP, lo que resulta en inestabilidad cromosómica, parada del ciclo celular y apoptosis posterior (Jones C, Plummer ER. PARP inhibitors and cancer therapy - early results and potential applications. *Br J Radiol.* 2008 Oct;81 Spec No 1:S2-5; Drew Y, Calvert H. The potential of PARP inhibitors in genetic breast and ovarian cancers. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Sep;1138:136-45; Farmer H, et.al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* 2005 Abr 14;434(7035):917-21).

[00164] Los pacientes deficientes en los genes BRCA pueden tener niveles de PARP regulados al alza. La regulación al alza de PARP puede ser un indicador de vías de reparación del ADN defectuosas y defectos genéticos semejantes a BRCA no reconocidos. La evaluación de la expresión génica de PARP y la reparación alterada del ADN, especialmente reparación defectuosa del ADN por recombinación homóloga, pueden usarse como un indicador de sensibilidad tumoral a un inhibidor de PARP. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el tratamiento de cáncer de mama puede incrementarse no sólo determinando el estado HR y/o HER2 del cáncer, sino también identificando el inicio temprano del cáncer en pacientes deficientes en BRCA y en reparación del ADN por recombinación homóloga midiendo el nivel de PARP. Los pacientes deficientes en BRCA y en reparación del ADN por recombinación homóloga tratables con inhibidores de PARP pueden identificarse si PARP está regulado al alza. Además, dichos pacientes deficientes en la reparación del ADN por recombinación homóloga pueden tratarse con inhibidores de PARP.

[00165] En algunas realizaciones, se recoge una muestra de un paciente que tiene una lesión de mama o crecimiento que se sospecha que es canceroso. Aunque dicha muestra puede ser cualquier tejido biológico disponible, en la mayoría de los casos la muestra será una parte de la lesión de mama sospechosa, ya sea obtenida por biopsia mínimamente invasiva o por cirugía terapéutica (p. ej. lumpectomía, mastectomía, mastectomía parcial o modificada o mastectomía radical, histerectomía, u ooforectomía). Dicha muestra también puede incluir todo o parte de uno o más nódulos linfáticos extraídos durante la cirugía terapéutica. La expresión de PARP puede analizarse entonces. En algunas realizaciones, si la expresión de PARP está por encima de un nivel predeterminado (p. ej. está regulada al alza respecto al tejido normal) el paciente puede tratarse con un inhibidor de PARP en combinación con un antimetabolito y un agente de platino. En otras realizaciones, si la expresión de PARP está por encima de un nivel predeterminado (p. ej. está regulada al alza respecto al tejido normal) el paciente puede tratarse con un inhibidor de PARP, incluyendo un inhibidor de PARP, tal como BA. Debe entenderse así que, aunque las realizaciones descritas en la presente memoria están dirigidas al tratamiento de cáncer de mama metastásico triple negativo, en algunas realizaciones el cáncer de mama no necesita tener estas características siempre que se satisfaga el límite de la regulación al alza de PARP.

[00166] En algunas realizaciones, los tumores que son deficientes en recombinación homóloga se identifican evaluando los niveles de la expresión de PARP. Si se observa regulación al alza de PARP, dichos tumores pueden tratarse con inhibidores de PARP. Otra realización es un método para tratar un cáncer deficiente en

recombinación homóloga que comprende evaluar el nivel de la expresión de PARP y, si se observa sobreexpresión, el cáncer se trata con un inhibidor de PARP.

Recogida, preparación y separación de las muestras

[00167] Las muestras biológicas pueden recogerse de varias fuentes de un paciente incluyendo una muestra de fluido corporal, o una muestra de tejido. Las muestras recogidas pueden ser muestras humanas normales y tumorales, aspiraciones del pezón. Las muestras pueden recogerse de individuos repetidamente durante un periodo de tiempo longitudinal (p. ej. aproximadamente una vez al día, una vez a la semana, una vez al mes, bianualmente o anualmente). La obtención de numerosas muestras de un individuo durante un periodo de tiempo puede usarse para verificar los resultados de detecciones anteriores y/o para identificar una alteración en el patrón biológico como resultado, por ejemplo, de la progresión de la enfermedad, tratamiento con fármacos, etc.

[00168] La preparación y separación de las muestras puede implicar cualquier procedimiento, dependiendo del tipo de muestra recogido y/o análisis de PARP. Dichos procedimientos incluyen, como ejemplo sólo, concentración, dilución, ajuste del pH, eliminación de polipéptidos muy abundantes (p. ej., albúmina, gamma globulina, y transferrina, etc.), adición de conservantes y calibradores, adición de inhibidores de proteasas, adición de desnaturalizantes, desalar las muestras, concentración de las proteínas de las muestras, extracción y purificación de lípidos.

[00169] La preparación de las muestras también puede aislar moléculas que están unidas en complejos no covalentes a otra proteína (p. ej., proteínas transportadoras). Este proceso puede aislar aquellas moléculas unidas a una proteína transportadora específica (p. ej., albúmina), o usar un proceso más general, tal como la liberación de moléculas unidas de todas la proteínas transportadoras mediante desnaturalización proteica, por ejemplo usando un ácido, seguido de la eliminación de las proteínas transportadoras.

[00170] La eliminación de proteínas no deseadas (p. ej., proteínas muy abundantes, poco informativas, o no detectables) de una muestra puede conseguirse usando reactivos con afinidad alta, filtros para peso molecular alto, ultracentrifugación y/o electrodiálisis. Los reactivos con afinidad alta incluyen anticuerpos u otros reactivos (p. ej. aptámeros) que se unen selectivamente a las proteínas muy abundantes. La preparación de las muestras también podría incluir cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad con iones metálicos, filtración en gel, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de adsorción, isoelectroenfoque y técnicas relacionadas. Los filtros para peso molecular incluyen membranas que separan las moléculas tomando como base el tamaño y el peso molecular. Dichos filtros pueden emplear además ósmosis reversa, nanofiltración, ultrafiltración y microfiltración.

[00171] La ultracentrifugación es un método para eliminar polipéptidos no deseados de una muestra. La ultracentrifugación es la centrifugación de una muestra a aproximadamente 15.000-60.000 rpm mientras se monitoriza con un sistema óptico la sedimentación (o ausencia de ésta) de partículas. La electrodiálisis es un procedimiento que usa una electromembrana o membrana semipermeable en un proceso en el que los iones se transportan a través de membranas semi-permeables de una disolución a otra bajo la influencia de un gradiente de potencial. Como las membranas usadas en electrodiálisis pueden tener la capacidad de transportar selectivamente iones que tienen carga positiva o negativa, rechazar iones de la carga opuesta, o permitir la migración de especies a través de una membrana semipermeable tomando como base el tamaño y la carga, esto hace que la electrodiálisis sea útil para la concentración, eliminación, o separación de electrolitos.

[00172] La separación y purificación en la presente invención puede incluir cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como electroforesis capilar (p. ej., en capilar o en chip) o cromatografía (p. ej., en capilar, columna o en un chip). La electroforesis es un método que puede usarse para separar moléculas

iónicas bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis puede realizarse en un gel, capilar, o en un microcanal en un chip. Los ejemplos de geles usados para electroforesis incluyen, almidón, acrilamida, óxidos de polietileno, agarosa, o combinaciones de éstos. Un gel puede modificarse por su entrecruzamiento, adición de detergentes, o desnaturalizantes, inmovilización de enzimas o anticuerpos (electroforesis de afinidad) o sustratos (zimografía) e incorporación de un gradiente de pH. Los ejemplos de capilares usados para electroforesis incluyen capilares que interactúan con un electropulverizador.

[00173] La electroforesis capilar (CE) se prefiere para separar moléculas hidrofílicas complejas y solutos altamente cargados. La tecnología CE también puede implementarse en chips microfluidicos. Dependiendo de los tipos de capilares y tampones usados, la CE puede segmentarse además en técnicas de separación tal como electroforesis capilar en zona (CZE), isoelectroenfoque capilar (CIEF), isotacoforesis capilar (cITP) y electrocromatografía capilar (CEC). Una realización para acoplar las técnicas CE a ionización por electropulverización implica el uso de disoluciones volátiles, por ejemplo, mezclas acuosas que contienen un ácido y/o base volátil y un orgánico tal como un alcohol o acetonitrilo.

[00174] La isotacoforesis capilar (cITP) es una técnica en la que los analitos se mueven a través del capilar a una velocidad constante pero que se separan no obstante por sus movilidades respectivas. La electroforesis capilar en zona (CZE), también conocida como CE en zona libre (FSCE), se basa en diferencias en la movilidad electroforética de las especies, determinada por la carga de la molécula, y la resistencia friccional que encuentra la molécula durante la migración que a menudo es directamente proporcional al tamaño de la molécula. El isoelectroenfoque capilar (CIEF) permite separar moléculas anfotéricas poco ionizables por electroforesis en un gradiente de pH. La CEC es una técnica híbrida entre la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) tradicional y CE.

[00175] Las técnicas de separación y purificación usadas en la presente invención incluyen cualquier procedimiento cromatográfico conocido en la técnica. La cromatografía puede basarse en la adsorción y elución diferencial de determinados analitos o en el reparto de analitos entre fases móviles y estacionarias. Los diferentes ejemplos de cromatografía incluyen, pero no están limitados a, cromatografía líquida (LC), cromatografía de gas (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) etc.

Identificación del nivel de PARP

[00176] La poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) también se conoce como poli (ADP-ribosa) sintasa y poli ADP-ribosiltransferasa. PARP cataliza la formación de polímeros de mono- y poli (ADP-ribosa) que pueden unirse a proteínas celulares (así como a sí mismos) y modifican de esta manera las actividades de estas proteínas. La enzima juega un papel en la regulación de la transcripción, proliferación celular, y remodelado de la cromatina (para revisión véase: D. D'amours et al. "Poly (ADP-ribosylation reactions in the regulation of nuclear functions," Biochem. J. 342: 249 -268 (1999)).

[00177] PARP comprende un dominio N-terminal de unión al ADN, un dominio de automodificación y un dominio C-terminal catalítico y varias proteínas celulares interaccionan con PARP. El dominio N-terminal de unión al ADN contiene dos restos de dedo de cinc. El factor amplificador de la transcripción 1 (TEF-1), el receptor α del retinoide X, la ADN polimerasa α , el factor de complementación cruzada 1 para la reparación de rayos X (XRCC1) y PARP en sí misma interaccionan con PARP en este dominio. El dominio de automodificación contiene un resto BRCT, uno de los módulos de interacción proteína-proteína. Este resto se encuentra originalmente en el C-terminal de BRCA1 (proteína 1 de susceptibilidad al cáncer de mama) y está presente en varias proteínas relacionadas con la reparación, recombinación del ADN y el control de la regulación de ciclo celular. El factor de transcripción 1 de unión a octámeros que contiene el dominio POU (Oct-1), Yin Yang (YY)1 y la enzima 9 de conjugación de la ubiquitina (ubc9) podrían interaccionar con este resto BRCT en PARP.

[00178] Más de 15 miembros de la familia PARP de genes están presentes en el genoma de mamíferos. La familia de proteínas PARP y la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG), que degrada poli(ADP-ribosa) a ADP-ribosa, podrían estar implicadas en varias funciones reguladoras del ciclo celular incluyendo respuesta a daños en el ADN y regulación transcripcional y pueden estar relacionadas con la carcinogénesis y la biología del cáncer en muchos aspectos.

[00179] Se han identificado varias proteínas de la familia PARP. Se ha encontrado que la tanquirasa es una proteína que interacciona con el factor regulador del telómero 1 (TRF-1) y está implicada en la regulación del telómero. PARP "vault" (bóveda) (VPARP) es un componente del complejo vault, que actúa como un transportador nuclear-citoplásmico. También se han identificado PARP-2, PARP-3 y PARP inducible por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TiPARP). Por lo tanto, el metabolismo de la poli (ADP-ribosa) podría estar relacionado con varias funciones reguladoras de la célula.

[00180] Un miembro de esta familia de genes es PARP-1. El producto del gen PARP-1 se expresa a altos niveles en el núcleo de las células y es dependiente para su activación del daño al ADN. Sin estar vinculado a ninguna teoría, se cree que PARP-1 se une a las roturas de ADN de cadena sencilla o doble a través de un dominio amino terminal de unión al ADN. La unión activa el dominio carboxi terminal catalítico y resulta en la formación de polímeros de ADP-ribosa en las moléculas diana. PARP-1 es en sí mismo una diana de poli ADP-ribosilación gracias a un dominio localizado centralmente de automodificación. La ribosilación de PARP-1 causa la disociación de las moléculas de PARP-1 del ADN. El proceso completo de unión, ribosilación, y disociación ocurre muy rápidamente. Se ha sugerido que esta unión transitoria de PARP-1 a sitios de daño en el ADN resulta en el reclutamiento de la maquinaria de reparación del ADN o puede actuar para suprimir la recombinación el tiempo suficiente para que se produzca el reclutamiento de la maquinaria de reparación.

[00181] La fuente de ADP-ribosa para la reacción de PARP es el dinucleótido de nicotinamida y adenosina (NAD). NAD se sintetiza en las células a partir de las reservas de ATP celular y así los niveles altos de activación de la actividad PARP pueden dar lugar rápidamente a la depleción de las reservas energéticas de la célula. Se ha demostrado que la inducción de la actividad de PARP puede dar lugar a la muerte celular que está correlacionada con la depleción de las reservas celulares de NAD y ATP. La actividad de PARP se induce en muchos casos de estrés oxidativo o durante la inflamación. Por ejemplo, durante la reperusión de tejidos isquémicos se genera óxido nítrico reactivo y el óxido nítrico resulta en la generación de especies de oxígeno reactivas adicionales incluyendo peróxido de hidrógeno, peroxinitrato y radical hidroxilo. Estas últimas especies pueden dañar directamente el ADN y el daño resultante induce la activación de la actividad de PARP. Frecuentemente, parece que ocurre una activación suficiente de la actividad PARP de manera que las reservas energéticas de la célula se agotan y la célula muere. Se cree que un mecanismo similar opera durante la inflamación cuando las células endoteliales y las células pro-inflamatorias sintetizan óxido nítrico que resulta en daño oxidativo del ADN en las células circundantes y la activación posterior de la actividad de PARP. Se cree que la muerte celular que resulta de la activación de PARP es un factor contribuyente principal en el grado de daño tisular que resulta del daño por isquemia-reperusión o de la inflamación.

[00182] En algunas realizaciones, el nivel de PARP en una muestra de un paciente se compara con una muestra estándar predeterminada. La muestra del paciente es típicamente de un tejido enfermo, tal como células o tejidos cancerosos. La muestra estándar puede ser del mismo paciente o de un sujeto diferente. La muestra estándar es típicamente una muestra normal, no enferma. Sin embargo, en algunas realizaciones, tales como para estadificar la enfermedad o para evaluar la eficacia del tratamiento, la muestra estándar es de un tejido enfermo. La muestra estándar puede ser una combinación de muestras de varios sujetos diferentes. En

algunas realizaciones, el nivel de PARP de un paciente se compara con un nivel predeterminado. Este nivel predeterminado se obtiene típicamente de muestras normales. Como se describe en la presente memoria, un “nivel predeterminado de PARP” puede ser un nivel de PARP usado para, sólo como ejemplo, evaluar un paciente que puede seleccionarse para tratamiento, evaluar una respuesta a un tratamiento con inhibidor de PARP, evaluar una respuesta a una combinación de un inhibidor de PARP y un segundo tratamiento con un agente terapéutico, y/o diagnosticar un paciente de cáncer, inflamación, dolor y/o condiciones relacionadas. Un nivel predeterminado de PARP puede determinarse en poblaciones de pacientes con o sin cáncer. El nivel predeterminado de PARP puede ser un único número, aplicable igualmente a cada paciente, o el nivel predeterminado de PARP puede variar según las subpoblaciones específicas de pacientes. Por ejemplo, los hombres podrían tener un nivel predeterminado de PARP diferente que las mujeres; los no fumadores pueden tener un nivel predeterminado de PARP diferente que los fumadores. La edad, peso y altura de un paciente pueden influir en el nivel predeterminado de PARP del individuo. Además, el nivel predeterminado de PARP puede ser un nivel determinado para cada paciente individualmente. El nivel predeterminado de PARP puede ser cualquier estándar adecuado. Por ejemplo, el nivel predeterminado de PARP puede obtenerse a partir del mismo ser humano o de uno diferente para el que se está evaluando una selección de pacientes. En una realización, el nivel predeterminado de PARP puede obtenerse a partir de una evaluación previa del mismo paciente. De esta manera, el progreso de la selección del paciente puede monitorizarse durante el tiempo. Además, el estándar puede obtenerse a partir de una evaluación de otro ser humano o de múltiples seres humanos, p. ej., grupos seleccionados de seres humanos. De esta manera, el grado de la selección del ser humano para el que se está evaluando la selección puede compararse con otros seres humanos adecuados, p. ej., otros seres humanos que están en una situación similar al ser humano de interés, tales como los que padecen una condición o condiciones similares o la misma condición o condiciones.

[00183] En algunas realizaciones de la presente invención el cambio de PARP desde el nivel predeterminado es aproximadamente 0,5 veces, aproximadamente 1,0 vez, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2,0 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3,0 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4,0 veces, aproximadamente 4,5 veces, o aproximadamente 5,0 veces. En algunas realizaciones el número de veces del cambio son menos de aproximadamente 1, menos de aproximadamente 5, menos de aproximadamente 10, menos de aproximadamente 20, menos de aproximadamente 30, menos de aproximadamente 40, o menos de aproximadamente 50. En otras realizaciones, los cambios en el nivel de PARP comparado con un nivel predeterminado son más de aproximadamente 1, más de aproximadamente 5, más de aproximadamente 10, más de aproximadamente 20, más de aproximadamente 30, más de aproximadamente 40, o más de aproximadamente 50. El número de veces del cambio preferido de un nivel predeterminado son aproximadamente 0,5, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,5, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,5, y aproximadamente 3,0.

[00184] El análisis de los niveles de PARP en pacientes es particularmente valioso e informativo, ya que permite al médico seleccionar más eficazmente los mejores tratamientos, así como utilizar tratamientos y regímenes de terapia más agresivos tomando como base el nivel regulado al alza o regulado a la baja de PARP. El tratamiento más agresivo, o tratamientos y regímenes de combinación, pueden servir para contrarrestar un mal pronóstico y tiempo de supervivencia global del paciente. Con esta información en su poder, el médico puede elegir proporcionar determinados tipos de tratamiento tal como tratamiento con inhibidores de PARP, y/o una terapia más agresiva.

[00185] En la monitorización de los niveles de PARP de un paciente, durante un periodo de tiempo, que puede ser días, semanas, meses, y en algunos casos, años, o varios intervalos de éstos, la muestra de fluido

corporal del paciente, p. ej., suero o plasma, puede recogerse a intervalos, según lo determine el profesional sanitario, tal como un médico o clínico, para determinar los niveles de PARP, y compararlos con los niveles de individuos normales durante el curso o tratamiento o enfermedad. Por ejemplo, las muestras del paciente pueden tomarse y monitorizarse cada mes, cada dos meses, o combinaciones de uno, dos, o tres intervalos de un mes según la invención. Además, los niveles de PARP del paciente obtenidos durante el tiempo pueden compararse convenientemente entre sí, así como con los valores de PARP, de controles normales, durante el periodo de monitorización, proporcionando de esta manera los valores de PARP propios del paciente, como un control interno, o personal, para una monitorización de PARP a largo plazo.

Técnicas para el Análisis de PARP

[00186] El análisis de PARP puede incluir el análisis de la expresión génica de PARP, incluyendo un análisis de ADN, ARN, análisis del nivel de PARP y/o análisis de la actividad de PARP incluyendo un nivel de mono- y poli-ADP-ribosilación. Sin limitar el alcance de la presente invención, puede emplearse cualquier técnica conocida en la técnica para el análisis de PARP y todas están en el alcance de la presente invención. Algunos de los ejemplos de dicha técnica de detección se proporcionan más adelante pero estos ejemplos no limitan de ninguna forma las numerosas técnicas de detección que pueden usarse en la presente invención.

[00187] **Perfiles de Expresión Génica:** Los métodos de perfiles de expresión génica incluyen métodos basados en el análisis de la hibridación de polinucleótidos, polirribonucleótidos, métodos basados en la secuenciación de polinucleótidos, polirribonucleótidos y métodos basados en proteómica. Los métodos más comúnmente usados en la técnica para la cuantificación de la expresión del ARNm en una muestra incluyen transferencia northern e hibridación in situ (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283 (1999)); ensayos de protección de ARNasa (Hod, *Biotechniques* 13:852-854 (1992)); y métodos basados en PCR, tal como reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) (Weis et al., *Trends in Genetics* 8:263-264 (1992)). Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos ADN-ARN o dúplex ADN-proteína. Los métodos representativos para el análisis de la expresión génica basados en secuenciación incluyen Análisis Seriado de la Expresión Génica (SAGE), y análisis de la expresión génica por secuenciación masiva en paralelo de la firma (MPSS), Hibridación Comparativa Genómica (CGH), Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP), Polimorfismo de un único nucleótido (SNP) y matrices de SNP, Hibridación in situ con Fluorescencia (FISH), Matrices de unión de proteínas y Micromatrices de ADN (conocidas también comúnmente como chip de gen o genoma, chip de ADN, o matriz de genes), Micromatrices de ARN.

[00188] **PCR con Transcriptasa Inversa (RT-PCR):** Uno de los métodos cuantitativos de perfiles de expresión génica basados en PCR más sensibles y más flexibles es RT-PCR, que puede usarse para comparar los niveles de ARNm en diferentes poblaciones de muestras, en tejidos normales y tumorales, con o sin tratamiento con fármacos, para caracterizar los patrones de expresión génica, para discriminar entre ARNm muy relacionados, y para analizar la estructura del ARN.

La primera etapa es el aislamiento del ARNm de una muestra diana. Por ejemplo, el material de partida puede ser típicamente ARN total aislado de tumores o líneas de células tumorales humanos, y los tejidos o líneas celulares normales correspondientes, respectivamente. Así, el ARN puede aislarse de una variedad de células y tejidos normales y enfermos, por ejemplo tumores, incluyendo mama, pulmón, colorrectal, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículos, ovarios, útero, etc., o líneas de células tumorales. Si la fuente del ARNm es un tumor primario, el ARNm puede extraerse, por ejemplo, a partir de tejidos congelados o fijados archivados, por ejemplo muestras de tejidos incluidas en parafina y fijadas (p. ej. fijadas con

formalina). Los métodos generales para la extracción del ARNm son muy conocidos en la técnica y se describen en textos estándar de biología molecular, incluyendo Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997).

[00189] En particular, el aislamiento del ARN puede realizarse usando un kit de purificación, conjunto de tampón y proteasas de fabricantes comerciales, según la instrucciones del fabricante. El ARN preparado a partir de un tumor puede aislarse, por ejemplo, por centrifugación de gradiente de densidad de cloruro de cesio. Como el ARN no puede servir de molde para PCR, la primera etapa en el perfil de expresión génica por RT-PCR es la transcripción inversa del molde de ARN en ADNc, seguido de su amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas usadas más comúnmente son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de aves (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). La etapa de transcripción inversa se ceba típicamente usando cebadores específicos, hexámeros al azar, o cebadores oligo-dT, dependiendo de las circunstancias y del objetivo del perfil de expresión. El ADNc obtenido puede usarse como molde en la reacción de PCR posterior.

[00190] Para minimizar errores y el efecto de la variación muestra-a-muestra, la RT-PCR se realiza habitualmente usando un estándar interno. El estándar interno ideal se expresa a un nivel constante en tejidos diferentes, y no se ve afectado por el tratamiento experimental. Los ARN usados más frecuentemente para normalizar los patrones de expresión génica son ARNm para los genes de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y β -actina.

[00191] Una variación más reciente de la técnica RT-PCR es la PCR cuantitativa en tiempo real, que mide la acumulación de productos de PCR mediante una sonda fluorogénica doblemente marcada. La PCR en tiempo real es compatible tanto con PCR competitiva cuantitativa, en la que se usa un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, como con PCR comparativa cuantitativa que usa un gen de normalización contenido en la muestra, o un gen de mantenimiento para RT-PCR.

[00192] Microscopía de Fluorescencia: Algunas realizaciones de la invención incluyen microscopía de fluorescencia para el análisis de PARP. La microscopía de fluorescencia permite observar la composición molecular de las estructuras para identificarlas mediante el uso de sondas marcadas con fluorescencia con una alta especificidad química tal como anticuerpos. Puede hacerse conjugando directamente un fluoróforo a una proteína e introduciendo ésta de nuevo en una célula. El análogo fluorescente puede comportarse como la proteína nativa y puede servir, por lo tanto, para revelar la distribución y comportamiento de esta proteína en la célula. Junto con RMN, espectroscopía de infrarrojo, dicroísmo circular y otras técnicas, la disminución de la fluorescencia intrínseca de la proteína y su observación asociada de la anisotropía de fluorescencia, extinción por colisión y transferencia de energía de resonancia son técnicas para la detección de proteínas. Las proteínas naturalmente fluorescentes pueden usarse como sondas fluorescentes. La medusa *Aequorea victoria* produce una proteína naturalmente fluorescente conocida como proteína verde fluorescente (GFP). La fusión de estas sondas fluorescentes con una proteína diana permite la visualización por microscopía de fluorescencia y la cuantificación por citometría de flujo.

Sólo como ejemplo, algunas de las sondas son marcapasos tales como, fluoresceína y sus derivados, carboxifluoresceínas, rodaminas y sus derivados, marcapasos atto, rojo fluorescente y naranja fluorescente: cy3/cy5 alternativas, complejos de lantánido con vidas medias largas, marcapasos con longitud de onda altas - hasta 800 nm, marcapasos cianina DY, y proteínas ficobilina. Sólo como ejemplo, algunas de las sondas son conjugados tales como, conjugados de isotiocianato, conjugados de estreptavidina, y conjugados de biotina. Sólo como ejemplo, algunas de las sondas son sustratos enzimáticos tales como, sustratos fluorogénicos y cromogénicos. Sólo como ejemplo, algunas de las sondas son fluorocromos tales como, FITC (fluorescencia

verde, excitación/emisión = 506/529 nm), rodamina B (fluorescencia naranja, excitación/emisión = 560/584 nm), y azul nilo A (fluorescencia roja, excitación/emisión = 636/686 nm). Las nanopartículas fluorescentes pueden usarse para varios tipos de inmunoensayos. Las nanopartículas fluorescentes se basan en diferentes materiales, tales como, poliacrilonitrilo, y poliestireno etc. Los rotores moleculares fluorescentes son sensores de restricción de microentornos que se vuelven fluorescentes cuando se restringe su rotación. Unos pocos ejemplos de restricción molecular incluyen aumento del marcaje (agregación), unión a anticuerpos, o ser atrapado en la polimerización de la actina. IEF (isoelectroenfoque) es una herramienta analítica para la separación de anfólitos, principalmente proteínas. Una ventaja de IEF-electroforesis en gel con un marcador IEF fluorescente es la posibilidad de observar directamente la formación de un gradiente. El marcador IEF fluorescente también puede detectarse por absorción de UV a 280 nm (20°C).

[00193] Puede sintetizarse una biblioteca de péptidos en soportes sólidos y, usando receptores con color, los soportes sólidos marcados pueden seleccionarse posteriormente uno a uno. Si los receptores no pueden indicar ningún color, pueden marcarse los anticuerpos que se unen a ellos. El método puede usarse no sólo en receptores de proteínas, sino también en el cribado de ligandos de unión de receptores artificiales sintetizados y así como el cribado de nuevos ligandos metálicos. También pueden usarse métodos automatizados para HTS y FACS (separador de células activado por fluorescencia). Un equipo FACS hace circular originalmente células a través de un tubo capilar y separa las células detectando sus intensidades de fluorescencia.

[00194] **Inmunoensayos:** Algunas realizaciones de la invención incluyen inmunoensayos para el análisis de PARP. En inmunotransferencia como la transferencia western de proteínas separadas por electroforesis puede identificarse una única proteína por su anticuerpo. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo de unión competitiva en el que el analito compite con un antígeno marcado por un conjunto limitado de moléculas de anticuerpo (p. ej. radioinmunoensayo, EMIT). El inmunoensayo puede ser no competitivo cuando el anticuerpo está presente en exceso y está marcado. Cuando el complejo analito antígeno aumenta, la cantidad de complejo anticuerpo-antígeno marcado también puede aumentar (p. ej. ELISA). Los anticuerpos pueden ser policlonales si se producen por la inyección del antígeno en un animal de experimentación, o monoclonales si se producen por técnicas de fusión celular y cultivo celular. En el inmunoensayo, el anticuerpo puede servir como un reactivo específico para el antígeno analito.

[00195] Sin limitar el alcance y contenido de la presente invención, algunos tipos de inmunoensayos son, sólo como ejemplo, RIA (radioinmunoensayo), inmunoensayos enzimáticos como ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzima), EMIT (técnica de inmunoensayo multiplicado por enzimas), inmunoensayo enzimático de micropartículas (MEIA), LIA (inmunoensayo luminiscente), y FIA (inmunoensayo fluorescente). Estas técnicas pueden usarse para detectar sustancias biológicas en el espécimen nasal. Los anticuerpos – ya se usen como primarios o secundarios – pueden marcarse con radioisótopos (p. ej. ¹²⁵I), marcajes fluorescentes (p. ej. FITC) o enzimas (p. ej. HRP o AP) que pueden catalizar reacciones fluorogénicas o luminogénicas.

[00196] La biotina, o vitamina H es una co-enzima que presenta una afinidad específica frente a la avidina y la estreptavidina. Esta interacción hace que los péptidos biotinilados sean una herramienta útil en varios ensayos de biotecnología para ensayos cualitativos y cuantitativos. Para mejorar el reconocimiento biotina/estreptavidina minimizando los impedimentos estéricos, puede ser necesario alargar la distancia entre la biotina y el péptido en sí mismo. Esto puede conseguirse acoplado una molécula espaciadora (p. ej., ácido 6-nitrohexanoico) entre la biotina y el péptido.

[00197] El ensayo cuantitativo de biotina para proteínas biotiniladas proporciona un ensayo fluorométrico sensible para determinar de manera precisa el número de marcadores de biotina en una proteína. Los péptidos

biotinilados se usan ampliamente en varios sistemas biomédicos de cribado que requieren la inmovilización de al menos uno de los componentes de la interacción en lechos, membranas, portas de vidrio o placas de microtitulación recubiertos con estreptavidina. Este ensayo se basa en el desplazamiento de un ligando etiquetado con un marcador inhibidor de la fluorescencia de los sitios de unión de la biotina de un reactivo. Para exponer cualquier grupo biotina en una proteína con más de un marcaje que está restringido estéricamente y es inaccesible para el reactivo, la proteína puede tratarse con proteasas para digerir la proteína.

[00198] EMIT es un inmunoensayo de unión competitiva que evita la etapa de separación habitual. Un tipo de inmunoensayo en el que la proteína está marcada con una enzima, y el complejo enzima-proteína-anticuerpo es enzimáticamente inactivo, lo que permite la cuantificación de la proteína no marcada. Algunas realizaciones de la invención incluyen ELISA para analizar PARP. ELISA se basa en anticuerpos selectivos unidos a soportes sólidos combinados con reacciones enzimáticas para producir sistemas capaces de detectar niveles bajos de proteínas. También se conoce como inmunoensayo enzimático o EIA. La proteína se detecta por anticuerpos que se han producido frente a ella, esto es, para los que es el antígeno. Habitualmente se usan anticuerpos monoclonales.

El ensayo puede requerir que los anticuerpos estén fijados a una superficie sólida, tal como la superficie interna de un tubo de ensayo, y una preparación de los mismos anticuerpos acoplada a una enzima. La enzima puede ser una (p. ej., β -galactosidasa) que produce un producto coloreado a partir de un sustrato incoloro. El ensayo puede realizarse, por ejemplo, llenando el tubo con la disolución del antígeno (p. ej., proteína) que se va a ensayar. Cualquier molécula de antígeno presente puede unirse a las moléculas de anticuerpo inmovilizadas. El conjugado anticuerpo-enzima puede añadirse a la mezcla de reacción. La parte de anticuerpo del conjugado se une a cualquier molécula de antígeno que se ha unido previamente, creando un "sandwich" anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Después de eliminar por lavado los conjugados no unidos, puede añadirse la disolución del sustrato. Después de un intervalo establecido, la reacción se para (p. j., añadiendo 1 N NaOH) y la concentración de producto coloreado formado se mide en un espectrofotómetro. La intensidad del color es proporcional a la concentración de antígeno unido.

[00199] ELISA también puede adaptarse para medir la concentración de anticuerpos, en cuyo caso, los pocillos se recubren con el antígeno apropiado. Puede añadirse la disolución (p. ej., suero) que contiene el anticuerpo. Después de que haya tenido tiempo para unirse al antígeno inmovilizado, puede añadirse una anti-inmunoglobulina conjugada con una enzima, que consiste en un anticuerpo frente a los anticuerpos que se están ensayando. Después de eliminar por lavado el reactivo que no ha reaccionado, puede añadirse el sustrato. La intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de anticuerpos marcados con enzima unidos (y así a la concentración de los anticuerpos que se están ensayando).

[00200] Algunas realizaciones de la invención incluyen radioinmunoensayos para analizar PARP. Pueden usarse isótopos radiactivos para estudiar el metabolismo, distribución y unión in vivo de pequeñas cantidades de los compuestos. Los isótopos radiactivos de ^1H , ^{12}C , ^{31}P , ^{32}S , y ^{127}I del cuerpo se usan como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , y ^{125}I . En el método de fijación del receptor en placas de 96 pocillos, los receptores pueden fijarse en cada pocillo usando anticuerpo o métodos químicos y los ligandos marcados radiactivos pueden añadirse a cada pocillo para inducir la unión. Los ligandos no unidos pueden eliminarse por lavado y el estándar puede determinarse por el análisis cuantitativo de la radiactividad de los ligandos unidos o la de los ligandos eliminados por lavado. La adición de compuestos diana de cribado puede inducir una reacción de unión competitiva con los receptores. Si los compuestos muestran una afinidad mayor por los receptores que los ligandos radiactivos estándar, la mayoría de los ligandos radiactivos no se unirá a los receptores y pueden

quedarse en disolución. Por lo tanto, analizando la cantidad de ligandos radiactivos unidos (o ligandos eliminados por lavado), puede indicarse el ensayo de la afinidad de los compuestos por los receptores.

[00201] El método de filtro de membrana puede necesitarse cuando los receptores no pueden fijarse a placas de 96 pocillos o cuando la unión del ligando necesita hacerse en fase de disolución. En otras palabras, después de la reacción de unión ligando-receptor en disolución, si la disolución de la reacción se filtra a través de papel de filtro de nitrocelulosa, las moléculas pequeñas incluyendo los ligandos pasan a través de él y sólo los receptores proteicos pueden quedarse en el papel. Sólo los ligandos que se unan fuertemente a los receptores pueden permanecer en el papel de filtro y la afinidad relativa de los compuestos añadidos puede identificarse por análisis cuantitativo de los ligandos radiactivos estándar.

[00202] Algunas realizaciones de la invención incluyen inmunoensayos de fluorescencia para el análisis de PARP. Los métodos inmunológicos basados en fluorescencia se basan en la unión competitiva de ligandos marcados frente a los no marcados en sitios del receptor altamente específicos. La técnica de fluorescencia puede usarse para inmunoensayos tomando como base los cambios en la vida media de la fluorescencia con concentraciones de analito cambiantes. Esta técnica puede funcionar con marcadores de vida media corta como isotiocianato de fluoresceína (FITC) (el donante) cuya fluorescencia puede ser extinguida por transferencia de energía a eosina (el aceptor). Pueden usarse varios compuestos fotoluminiscentes, tales como cianinas, oxazinas, tiazinas, porfirinas, ftalocianinas, hidrocarburos aromáticos polinucleares fluorescentes que emiten en el infrarrojo, ficobiliproteínas, escuarainas y complejos organo-metálicos, hidrocarburos y marcadores azo.

[00203] Los métodos inmunológicos basados en fluorescencia pueden ser, por ejemplo, heterogéneos u homogéneos. Los inmunoensayos heterogéneos comprenden la separación física del analito marcado unido del libre. El analito o anticuerpo puede unirse a una superficie sólida. La técnica puede ser competitiva (para una mayor selectividad) o no competitiva (para una mayor sensibilidad). La detección puede ser directa (sólo se usa un tipo de anticuerpo) o indirecta (se usa un segundo tipo de anticuerpo). Los inmunoensayos homogéneos no comprenden una separación física. El antígeno marcado con fluoróforo de doble anticuerpo participa en una reacción en equilibrio con anticuerpos dirigidos tanto frente al antígeno como al fluoróforo. El antígeno marcado y no marcado puede competir por un número limitado de anticuerpos anti-antígeno.

[00204] Algunos de los métodos de inmunoensayo fluorescentes incluyen un método simple de marcaje con fluorescencia, transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET), fluorescencia en tiempo resuelto (TRF), y microscopía de sonda de barrido (SPM). El método simple de marcaje con fluorescencia puede usarse para la unión receptor-ligando, actividad enzimática usando la fluorescencia pertinente, y como un indicador fluorescente de varios cambios fisiológicos in vivo tales como pH, concentración iónica, y presión eléctrica. TRF es un método que mide selectivamente la fluorescencia de la serie lantánido después de que haya finalizado la emisión de otras moléculas fluorescentes. TRF puede usarse con FRET y la serie lantánido puede volverse donante o aceptor. En la microscopía de sonda de barrido, en la fase de captura, por ejemplo, al menos un anticuerpo monoclonal se adhiere a una fase sólida y se utiliza un microscopio de sonda de barrido para detectar los complejos antígeno/anticuerpo que pueden estar presentes en la superficie de la fase sólida. El uso del microscopio de tunel de barrido elimina la necesidad de marcajes que normalmente se utilizan en muchos sistemas de inmunoensayo para detectar los complejos antígeno/anticuerpo.

[00205] **Métodos para la identificación de proteínas:** Sólo como ejemplo, los métodos para la identificación de proteínas incluyen secuenciación de bajo rendimiento mediante degradación de Edman, técnicas de espectrometría de masa, huella de la masa peptídica, secuenciación *de novo*, y ensayos basados en anticuerpos. Los ensayos de cuantificación de proteínas incluyen tinción de geles con marcadores

fluorescentes, métodos de etiquetado o modificación química (*es decir*, etiquetas de afinidad codificadas por isótopo (ICATS), cromatografía diagonal combinada fraccionada (COFRADIC)). La proteína purificada también puede usarse para la determinación de la estructura cristalina tridimensional, que puede usarse para modelar las interacciones intermoleculares. Los métodos comunes para determinar la estructura cristalina tridimensional incluyen cristalografía de rayos X y espectroscopía RMN. Las características indicativas de la estructura tridimensional de las proteínas pueden probarse con espectrometría de masa. Usando el entrecruzamiento químico para acoplar partes de la proteína que están cerca espacialmente, pero separadas en la secuencia, puede inferirse información respecto a la estructura global. Siguiendo el intercambio de protones amida con deuterio del disolvente, es posible probar la accesibilidad al disolvente de varias partes de la proteína.

[00206] En una realización, se usa separación de células activada por fluorescencia (FACS) para identificar las células que expresan PARP. FACS es un tipo especializado de citometría de flujo. Proporciona un método para separar una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más contenedores, una célula cada vez, tomando como base las características específicas de dispersión de la luz y fluorescentes de cada célula. Proporciona el registro cuantitativo de señales de fluorescencia de células individuales así como la separación física de células con un interés particular. En otra realización más, se usan dispositivos basados en microfluidos para evaluar la expresión de PARP.

[00207] La espectrometría de masa también puede usarse para caracterizar PARP de muestras de pacientes. Los dos métodos para la ionización de proteínas completas son ionización por electropulverización (ESI) y desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI). En el primero, las proteínas intactas se ionizan por cualquiera de las dos técnicas descritas anteriormente, y se introducen en un analizador de masa. En el segundo, las proteínas se digieren enzimáticamente en péptidos más pequeños usando un agente tal como tripsina o pepsina. También se usan otros agentes de digestión proteolíticos. La colección de productos peptídicos se introduce en el analizador de masa. Esto es referido habitualmente como el método "ascendente" de análisis de proteínas.

[00208] El análisis de masa de la proteína completa se realiza usando bien MS de tiempo de vuelo (TOF), o resonancia de ciclotrón ión con transformada de Fourier (FT-ICR). El instrumento usado para el análisis de masa peptídica es la trampa de ión cuadrupolar. Los instrumentos de múltiples etapas cuadrupolar de tiempo de vuelo y tiempo de vuelo MALDI también encuentran un uso en esta aplicación.

[00209] Se usan dos métodos para fraccionar proteínas, o sus productos peptídicos procedentes de una digestión enzimática. El primer método fracciona proteínas completas y se denomina electroforesis en gel bidimensional. El segundo método, cromatografía líquida de alta resolución se usa para fraccionar péptidos después de una digestión enzimática. En algunas situaciones, puede ser necesario combinar estas dos técnicas.

[00210] Existen dos formas en las que la espectroscopía de masa puede usarse para identificar proteínas. La masa de péptidos usa las masas de los péptidos proteolíticos como entrada para una búsqueda en una base de datos de masas predichas que surgirían de la digestión de una lista de proteínas conocidas. Si una secuencia proteica en la lista de referencia ocasiona un número significativo de masas predichas que coinciden con los valores experimentales, existe alguna evidencia de que esa proteína está presente en la muestra original.

[00211] MS en tándem también es un método para identificar proteínas. La disociación inducida por colisión se usa en aplicaciones principales para generar un conjunto de fragmentos a partir de un ión peptídico específico. El proceso de fragmentación ocasiona principalmente productos de escisión que se rompen a lo largo de los enlaces peptídicos.

[00212] Se han descrito varios métodos algorítmicos diferentes para identificar péptidos y proteínas a partir de espectrometría de masa en tándem (MS/MS), secuenciación peptídica de novo y búsqueda basada en etiquetas de secuencia. Una opción que combina un intervalo completo de características de los análisis de datos es PEAKS. Otros programas informáticos de análisis de espec de mas existentes incluyen: Obtención de huellas de fragmentos peptídicos SEQUEST, Mascot, OMSSA y X!Tandem).

[00213] Las proteínas también pueden cuantificarse por espectrometría de masa. Típicamente, se incorporan en una muestra isótopos estables (p. ej. no radiactivos) pesados de carbono (C13) o nitrógeno (N15) mientras que la otra se marca con los isótopos ligeros correspondientes (p. ej. C12 y N14). Las dos muestras se mezclan antes del análisis. Los péptidos obtenidos de las diferentes muestras pueden distinguirse debido a su diferencia de masa. La relación de sus intensidades de pico se corresponde con la relación de abundancia relativa de los péptidos (y proteínas). Los métodos para el marcaje isotópico son SILAC (marcaje con isótopos estable con aminoácidos en cultivo celular), marcaje con O18 catalizado por tripsina, ICAT (etiquetado de afinidad codificado por isótopo), ITRAQ (etiquetas de isótopos para la cuantificación relativa y absoluta). La espectrometría de masa “semi-cuantitativa” puede realizarse sin marcar las muestras.

Típicamente, esto se hace con análisis MALDI (en modo lineal). La intensidad de los picos, o el área de los picos, de moléculas individuales (típicamente proteínas) se correlaciona aquí con la cantidad de proteína en la muestra. Sin embargo, la señal individual depende de la estructura primaria de la proteína, de la complejidad de la muestra, y de los ajustes del instrumento.

[00214] La secuenciación N-terminal ayuda en la identificación de proteínas desconocidas, confirma la identidad y fidelidad de proteínas recombinantes (marco de lectura, punto de inicio de la traducción, *etc.*), ayuda en la interpretación de datos de RMN y cristalográficos, demuestra grados de identidad entre proteínas, o proporciona datos para el diseño de péptidos sintéticos para la generación de anticuerpos, *etc.* La secuenciación N-terminal utiliza la química de degradación de Edman, que elimina secuencialmente restos de aminoácidos del N-terminal de la proteína y los identifica por HPLC de fase inversa. La sensibilidad puede ser a nivel de 100s femtomoles y las lecturas de secuencia larga (20-40 restos) pueden obtenerse habitualmente desde unos pocos 10s picomoles de material de partida. Las proteínas puras (>90%) pueden generar datos fácilmente interpretables, pero las mezclas de proteínas insuficientemente purificadas también pueden proporcionar datos útiles, sometidos a una interpretación de datos rigurosa. Las proteínas modificadas en el extremo N-terminal (especialmente acetiladas) no pueden secuenciarse directamente, ya que la ausencia de un grupo amino primario libre impide la química de Edman. Sin embargo, la proteólisis limitada de la proteína bloqueada (*p. ej.* usando bromuro de cianógeno) puede permitir la generación de una mezcla de aminoácidos en cada ciclo del instrumento, que puede someterse a análisis en bases de datos con el fin de interpretar la información de secuencia significativa. La secuenciación C-terminal es una modificación posterior a la traducción, que afecta a la estructura y actividad de una proteína. Varias situaciones patológicas pueden asociarse con un procesamiento alterado de las proteínas y la secuenciación C-terminal proporciona una herramienta adicional para la investigación de la estructura de la proteína y de los mecanismos de procesamiento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión de PARP1 en cáncer de mama IDC

[00215] Estudios previos han mostrado actividad de PARP incrementada en cánceres de ovario, carcinomas hepatocelulares, y tumores rectales, comparado con tejidos control sanos normales, así como en linfocitos humanos de sangre periférica de pacientes con leucemia (Yalcintepe L, et.al. Braz J Med Biol Res 2005;38:361-5. Singh N. et.al. Cancer Lett 1991;58:131-5; Nomura F, et.al. J Gastroenterol Hepatol 2000;15:529-35). Esta invención usa las bases de datos de expresión génica para examinar la regulación génica de PARP1 en más de 2.000 tejidos humanos malignos primarios y normales. Aunque la expresión y actividad de PARP1 es muy baja y uniforme en la mayoría de los tejidos y órganos humanos normales, está regulada al alza en células tumorales y malignidades primarias humanas seleccionadas, encontrándose las diferencias más destacadas en cánceres de mama, ovario, pulmón y de útero (Figura 1).

Muestras de tejido

[00216] Los especímenes se recogieron como parte de un procedimiento quirúrgico normal y se congelaron rápido en los 30 minutos posteriores a la resección. La revisión y confirmación patológica interna se realizan en muestras sometidas a análisis. Se usan portas de vidrio teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) generados a partir de tejidos adyacentes para confirmar y clasificar categorías diagnósticas y para evaluar la celularidad neoplásica. La expresión de ER, PR, y HER2 se determina usando inmunohistoquímica e hibridación *in situ* con fluorescencia. Estos resultados, así como los datos de patología y clínicos concomitantes, se anotan con el inventario de la muestra y las bases de datos de gestión (bases de datos Ascenta, BioExpress; GeneLogic, Inc., Gaithersburg, MD).

Extracción de ARN y Perfiles de Expresión

[00217] La extracción e hibridación del ARN se realizan como describen Hansel et al. La calidad de la matriz de datos se evalúa usando una aplicación de matriz de alto rendimiento (Ascenta, Bioexpress Gene Logic, Gaithersburg MD y Affymetrix, Santa Clara, CA), que evalúa los datos frente a múltiples estándares objetivos incluyendo la relación 5'/3' GAPDH, relación señal/ruido, y de fondo así como otros parámetros adicionales. El análisis con GeneChip se realiza con el programa informático de bases de datos Affymetrix Microarray Analysis Suite versión 5.0, Data Mining Tool 2.0, y Microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA). Todos los genes representados en GeneChip se normalizan globalmente y se escalan a una intensidad de señal de 100.

Análisis de los Datos de Micromatriz

[00218] Muestras de tejido patológicamente normal se usan para determinar la expresión basal del ARNm de PARP1. Se calculan la media y los límites de confianza superiores (UCL) 90%, 95%, 99%, y 99,9% para un valor individual predicho. Debido a que se está evaluando la probabilidad de que muestras individuales externas al conjunto normal estén dentro de la distribución de la línea base, se selecciona el intervalo de predicción, en lugar del intervalo de confianza para la media, para estimar el intervalo esperado para medidas individuales futuras. El intervalo de predicción se define por la fórmula, $\bar{X} \pm AS\sqrt{1 + (1/n)}$, en la que $\bar{X}$ es la media de las muestras de mama normales, S es la desviación estándar, n es el tamaño de la muestra, y A es el percentil $100(1-(p/2))^n$ de la distribución t de Student con $n-1$ grados de libertad.

Muestras de tejido patológicamente normal se usan para determinar la expresión de PARP1 en la línea base. Las muestras se agrupan en varias subcategorías según características que incluyen estadio del tumor, estado de tabaquismo, estado de CA125, o edad. Cada muestra de tumor se evalúa según UCL 90%, 95%, 99%, ó 99,9%. El análisis se realiza usando SAS v8.2 para Windows (www.sas.com).

Las correlaciones de Pearson se calculan para conjuntos de 11 sondas comparados con PARP1. Las correlaciones se basan en el conjunto completo de 194 muestras. La correlación del producto-momento de Pearson se define

por la fórmula,

$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

en la que $\bar{X}$ es la media del conjunto de la sonda PARP1 y $\bar{Y}$ es la media el conjunto de la sonda con la que se está correlacionando PARP1. La

significancia estadística se determina por la fórmula $\frac{(n-2)^{1/2}r}{(1-r^2)^{1/2}}$, en la que r es la correlación y n es el número de muestras. Se asume que el valor resultante tiene una distribución t con n-2 grados de libertad.

Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa Multiplex (RT-PCR):

[00219] La RT-PCR Multiplex se realiza usando 25 ng de ARN total de cada muestra como se ha descrito previamente (Khan et al., 2007). El ensayo multiplex usado para este estudio se diseña para detectar ARN de muestras incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) o de tejidos congelados. La concentración de ARN se determina usando el KIT de Cuantificación de ARN RiboGreen (Invitrogen) con un Contador Multilabel Wallac Victo r2 1420. Una muestra de ARN de cada muestra se analiza en un Bioanalizador Agilent siguiendo las instrucciones del Bioanalizador Agilent 2100. Las reacciones de transcripción inversa (RT) se realizan como se ha descrito previamente con el Applied Biosystems 9700. Las reacciones de PCR se realizan en cada ADNc con el Applied Biosystems 9700. A las reacciones de RT se añade ARN de Kanamicina para monitorizar la eficacia de las reacciones de RT y PCR. Los controles usados incluyen ARN control positivo, un control sin molde, y un control sin transcriptasa inversa. Las reacciones de PCR se analizan por electroforesis capilar. Las reacciones de PCR marcadas con fluorescencia se diluyen, se combinan con Genome Lab size standard-400 (Beckman-Coulter,), se desnaturalizan y se ensayan con el Sistema de Análisis Genético CEQ 8800. La expresión de cada gen diana respecto a la expresión de β -glucuronidasa (GUSB) en la misma reacción se muestra como la media y la desviación estándar de 3 evaluaciones independientes para cada muestra.

[00220] Los pacientes con cáncer de mama con carcinoma ductal infiltrante (IDC) tienen un incremento de 1,8 veces en la expresión media de PARP1 comparado con los tejidos de mama normales ($P < ,00001$). De forma importante, la sobreexpresión de PARP1 ocurre lo más frecuentemente en tejidos de cáncer de mama que son negativos para ER, PR, o HER2 (Tabla 1).

TABLA 1 Sobreexpresión de PARP1 en tejidos de mama IDC

Subtipo IDC	n	% de Muestras con Sobreexpresión de PARP1
Normal	68	2,9%
IDC	169	30,2%
ER+	35	22,9%
ER-	18	55,6%
PR+	26	23,1%
PR-	20	45,0%
HER2+	24	29,2%
HER2-	10	70,0%
ER+/PR+	26	23,1%
ER-/PR-	8	62,5%
ER+/PR-	8	25,0%

La sobreexpresión de PARP1 se definió por muestras que superaban el límite de confianza superior del 95% en una distribución de tejido de cáncer de mama normal.

Ejemplo 2: Combinación de 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) con quimioterapia Cultivo Celular

[00221] Las células de cáncer de mama se obtienen de la ATCC y se cultivan en Medio Eagle Modificado por Dulbecco con 10% de suero fetal bovino. Las células se plaquean a 10^5 células por placa de cultivo celular

P100 o a 10^4 células por placa de cultivo celular P60 en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos o DMSO control. Después del tratamiento, el número de células pegadas se mide usando un contador Coulter, y por tinción con azul de metileno al 1%. El azul de metileno se disuelve en una mezcla 50%-50% de Metanol y agua. Las células se plaquean en placas de 24 ó 96 pocillos y se tratan como se ha planeado, el medio se aspira, las células se lavan con PBS, se fijan en metanol durante 5-10 min, el metanol se aspira y se deja que la placas se sequen completamente. La disolución de azul de metileno se añade a los pocillos y las placas se incuban durante 5 min. La disolución de tinción se elimina y las placas se lavan con dH₂O hasta que los lavados no son azules. Después de que las placas estén completamente secas, se añade una pequeña cantidad de 1N HCl a cada pocillo para extraer el azul de metileno. Se usan la lectura de la DO a 600nm y una curva de calibración para determinar el número de células.

Compuestos

[00222] Los compuestos se disuelven directamente de polvo seco a una disolución madre 10 mM en DMSO para cada experimento independiente. Los experimentos control se realizan con el volumen/concentración del vehículo (DMSO) equivalente; en estos controles, las células no muestran cambios en su crecimiento o distribución del ciclo celular.

Ensayos de Exclusión de PI, Ciclo Celular y TUNEL

[00223] Después de la adición de los fármacos y de la incubación, las células se tripsinizan y se toman alícuotas de las muestras para recuento y ensayo de exclusión de PI (Yoduro de Propidio). Una parte de las células se centrifuga y se resuspende en 0,5 ml de PBS enfriado en hielo que contiene 5 µg/ml de PI. La otra parte de las células se fija en etanol al 70 % enfriado en hielo y se almacena en un congelador toda la noche. Para el análisis del ciclo celular, las células se tiñen con yoduro de propidio (PI) por procedimientos estándar. El contenido de ADN celular se determina por citometría de flujo usando BD LSR II FACS, y los porcentajes de células en G₁, S o G₂/M se determinan usando el programa informático ModFit.

[00224] Las células se marcan para apoptosis con el “Kit para la Detección *In Situ* de Muerte Celular, Fluoresceína” (Roche Diagnostics Corporation, Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Brevemente, las células fijadas se centrifugan y se lavan una vez en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, se resuspenden en 2 ml de tampón de permeabilización (0,1% Tritón X-100 y 0,1% citrato de sodio en PBS) durante 25 min a temperatura ambiente y se lavan dos veces en 0,2 ml PBS/1% BSA. Las células se resuspenden en 50 µl de mezcla de reacción TUNEL (enzima TdT y disolución de marcado) y se incuban durante 60 min a 37 °C en una atmósfera oscura humidificada en un incubador. Las células marcadas se lavan una vez en PBS/1% BSA, se resuspenden en 0,5 ml de PBS enfriado en hielo que contiene 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante al menos 30 min. Todas las muestras de células se analizan con un BD LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA).

Ensayo de marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU)

[00225] Se añaden 50 µl de disolución madre (1 mM) de BrdU (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para proporcionar una concentración final 10 µM de BrdU. Las células se incuban durante 30 min a 37°C y se fijan en etanol al 70 % enfriado en hielo y se almacenan en una habitación fría (4°C) toda la noche. Las células fijadas se centrifugan y se lavan una vez en 2 ml PBS, se resuspenden en 0,7 ml de disolución de desnaturalización (0,2 mg/ml pepsina en 2 N HCl) durante 15 min a 37 °C en oscuridad y se suspenden con 1,04 ml 1M tampón Tris (Trizma base, Sigma Chemical Co.) y se lavan en 2 ml de PBS. Las células se resuspenden en 100-µl de anticuerpo anti-BrdU (DakoCytomation, Carpinteria, CA) con una dilución 1:100 en tampón permeable TBFP (0,5 % Tween-20,

1 % albúmina de suero bovino y 1 % suero fetal bovino en PBS) y se incuban durante 25 min a temperatura ambiente en oscuridad y se lavan en 2 ml de PBS. Las células marcadas con el anticuerpo primario se resuspenden en 100 µl de fragmento F(ab')₂ Alexa Fluor de IgG (H+L) anti-ratón de cabra (2 mg/mL) (Molecular Probes, Eugene, OR) con una dilución 1:200 en tampón permeable TBFP y se incuban durante 25 min a temperatura ambiente en oscuridad y se lavan en 2 ml de PBS, se resuspenden en 0,5 ml de PBS enfriado en hielo que contiene 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante al menos 30 min. Todas las muestras de células se analizan con un BD LSR II (BD Biosciences, San Jose, CA).

[00226] Las combinaciones de 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) con varios agentes quimioterapéuticos se han ensayado en modelos de cáncer *in vitro* e *in vivo*. La evaluación de BA en combinación con gemcitabina o carboplatino en la línea celular MDA-MB-468 de adenocarcinoma de mama, obtenida de un paciente con adenocarcinoma metastásico triple negativo, muestra que BA potencia la parada del ciclo celular en S y G2/M e incrementa los efectos citotóxicos inducidos tanto por carboplatino como por gemcitabina (Figura 2).

[00227] La actividad de BA en combinación con gemcitabina y carboplatino se evalúa en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 de carcinoma de mama metastásico triple negativo humano en ratones desnudos nu/nu. BA incrementa la actividad de la combinación de gemcitabina y carboplatino y resulta en 4 respuestas parciales (PR) y 2 respuestas completas (CR) y un superviviente sin tumor (TFS) después de 35 días de administración del fármaco (Tabla 2). La combinación de BA con gemcitabina y carboplatino se tolera bien.

TABLA 2: Actividad *in vivo* de BA en combinación con gemcitabina/carboplatino en el modelo de xenoinjerto MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama triple negativo

Tratamiento	Respuesta Parcial	Respuesta Completa	Supervivientes sin Tumor
Control	0	0	0
Gemcitabina (15 mg/kg; ip;q3dx4 ip) + Carboplatino (10 mg/kg; ip;qwx3)	4	0	0
BSI-201 (50 mg/kg; ip; biwk) + Gemcitabina (15 mg/kg; ip;q3dx4 ip) + Carboplatino (10 mg/kg; ip;qwx3)	4	2	1

[00228] Así, la 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) puede potenciar la actividad de una variedad de agentes quimioterapéuticos citotóxicos, incluyendo carboplatino y gemcitabina.

Ejemplo 3: Combinación de 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) con irinotecán

[00229] Las células de cáncer de mama se obtienen de la ATCC y se cultivan en Medio Eagle Modificado por Dulbecco con 10% de suero fetal bovino. Las células se plaquean a 10⁵ células por placa de cultivo celular P100 o a 10⁴ células por placa de cultivo celular P60 en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos o DMSO control. Después del tratamiento, el número de células pegadas se mide usando un contador Coulter, y por tinción con azul de metileno al 1%. El azul de metileno se disuelve en una mezcla 50%-50% de Metanol y agua. Las células se plaquean en placas de 24 ó 96 pocillos y se tratan como se ha planeado, el medio se aspira, las células se lavan con PBS, se fijan en metanol durante 5-10 min, el metanol se aspira y se deja que la placas se sequen completamente. La disolución de azul de metileno se añade a los pocillos y las placas se incuban durante 5 min. La disolución de tinción se elimina y las placas se lavan con dH₂O hasta que los lavados no son azules. Después de que las placas estén completamente secas, se añade

una pequeña cantidad de 1N HCl a cada pocillo para extraer el azul de metileno. Se usan la lectura de la DO a 600nm y una curva de calibración para determinar el número de células.

[00230] Los compuestos se disuelven directamente de polvo seco a una disolución madre 10 mM en DMSO para cada experimento independiente. Los experimentos control se realizan con el volumen/concentración del vehículo (DMSO) equivalente; en estos controles, las células no muestran cambios en su crecimiento o distribución del ciclo celular.

[00231] Los ensayos de exclusión de PI, ciclo celular, ensayos TUNEL, y ensayos de marcaje con BrdU se realizan como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

[00232] Las combinaciones de varias concentraciones de 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) con irinotecán se ensayan en modelos de cáncer *in vitro*. La evaluación de BA en combinación con irinotecán en la línea celular MDA-MB-468 de adenocarcinoma de mama triple negativo, obtenida de un paciente con adenocarcinoma metastásico triple negativo, muestra que BA potencia la parada del ciclo celular en S y G2/M e incrementa los efectos citotóxicos inducidos por irinotecán (Tabla 3).

TABLA 3: Regulación del ciclo celular de carcinoma de mama triple negativo MDA-MB-468 tratado con 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) en una combinación con irinotecán

	G1	S	G2/M	células vitales, % control
Irinotecán				
Irinotecán 0 uM + BA uM				
0	64,40	24,18	11,42	100,0
50	65,50	23,48	11,02	91,5
100	57,72	26,93	15,34	67,5
Irinotecán 5 uM + BA uM				
0	38,17	33,77	28,05	48,6
50	24,94	41,85	33,21	31,6
100	9,28	51,43	39,29	23,4

[00233] Así, la 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) puede potenciar la actividad de una variedad de agentes quimioterapéuticos citotóxicos, incluyendo carboplatino, gemcitabina e irinotecán.

Ejemplo 4: Combinación de 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) con el inhibidor de IGF1R Picropodofilina (PPP)

[00234] Las células de cáncer de mama se obtienen de la ATCC y se cultivan en Medio Eagle Modificado por Dulbecco con 10% de suero fetal bovino. Las células se plaquean a 10⁵ células por placa de cultivo celular P100 o a 10⁴ células por placa de cultivo celular P60 en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos o DMSO control. Después del tratamiento, el número de células pegadas se mide usando un contador Coulter, y por tinción con azul de metileno al 1%. El azul de metileno se disuelve en una mezcla 50%-50% de Metanol y agua. Las células se plaquean en placas de 24 ó 96 pocillos y se tratan como se ha planeado, el medio se aspira, las células se lavan con PBS, se fijan en metanol durante 5-10 min, el metanol se aspira y se deja que la placas se sequen completamente. La disolución de azul de metileno se añade a los pocillos y las placas se incuban durante 5 min. La disolución de tinción se elimina y las placas se lavan con

dH2O hasta que los lavados no son azules. Después de que las placas estén completamente secas, se añade una pequeña cantidad de 1N HCl a cada pocillo para extraer el azul de metileno. Se usan la lectura de la DO a 600nm y una curva de calibración para determinar el número de células.

[00235] Los compuestos se disuelven directamente de polvo seco a una disolución madre 10 mM en DMSO para cada experimento independiente. Los experimentos control se realizan con el volumen/concentración del vehículo (DMSO) equivalente; en estos controles, las células no muestran cambios en su crecimiento o distribución del ciclo celular.

[00236] Los ensayos de exclusión de PI, ciclo celular, ensayos TUNEL, y ensayos de marcaje con BrdU se realizan como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

[00237] Las combinaciones de varias concentraciones de 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) con el inhibidor del receptor del factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF1R) Picropodofilina (PPP) se ensayan en modelos de cáncer *in vitro*. La evaluación de BA en combinación con PPP en la línea celular MDA-MB-468 de adenocarcinoma de mama triple negativo, obtenida de un paciente con adenocarcinoma metastásico triple negativo, muestra que BA potencia la parada del ciclo celular en S y G2/M e incrementa los efectos citotóxicos inducidos por PPP (Tabla 4).

TABLA 4: Regulación del ciclo celular de carcinoma de mama triple negativo MDA-MB-468 tratado con 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) en una combinación con el inhibidor de IGF1R Picropodofilina (PPP)

	G1	S	G2/M	Célula Vital% control
PPP 0 nM + 201 uM				
0	50,96	30,37	16,04	100
50	50,20	31,34	15,21	82
100	40,63	34,52	20,16	61
PPP 200 nM + 201 uM				
0	51,42	30,22	15,01	89
50	49,75	31,41	15,10	77
100	37,51	35,58	21,30	59
PPP 400 nM + 201 uM				
0	37,29	25,32	20,17	60
50	32,88	28,47	22,37	42
100	23,62	31,78	29,98	32

[00238] Así, la 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) puede potenciar la actividad de inhibidores dirigidos a receptores de factores de crecimiento incluyendo picropodofilina (PPP).

Ejemplo 5: Tratamiento de Cáncer de Mama Triple Negativo con BA

[00239] Se realiza un estudio multicentro, abierto, aleatorizado para demostrar la eficacia terapéutica en el tratamiento de cáncer de mama metastásico triple negativo con 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA).

Objetivos del Estudio: Los objetivos primarios de este estudio son los siguientes:

[00240] Tasa de Beneficio Clínico (CBR=CR+PR+SD ≥ 6 meses): Determinar que BA producirá una CBR de 30% o mayor comparado con la CBR de 45% asociada con el tratamiento con gemcitabina y carboplatino.

- Para estudiar más la seguridad y tolerabilidad de BA
- Los objetivos secundarios de este estudio son los siguientes:
- Tasa de Respuesta Global (ORR)

- Supervivencia sin progresión (PFS)
- Evaluación de la toxicidad asociada con cada brazo
- Los objetivos exploratorios de este estudio son los siguientes:
- Caracterizar la inhibición de la actividad de PARP por BA
- Caracterizar la actividad de PARP en muestras históricas de tejido tumoral
- Estudiar el estado de BRCA en cáncer de mama triple negativo
- Estudiar la respuesta en sujetos con cáncer y mutaciones en BRCA conocidas comparado con sujetos sin estas mutaciones
- Clasificar el tejido de cáncer de mama como basal o luminal

[00241] Diseño del estudio: Un estudio de seguridad y eficacia abierto, de 2 brazos aleatorizado en el que hasta 90 pacientes (45 en cada brazo) se aleatorizarán bien en:

- Brazo 1 de Estudio: Gemcitabina (1.000 mg/m²; 30 min infusión IV) y Carboplatino (2 AUC; 60 min infusión IV) en los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días; o
- Brazo 2 de Estudio: 4-yodo-3-nitrobenzamida (4 mg/kg 1 hora infusión IV) en los días 1, 4, 8 y 11 de cada ciclo de 21 días
- Los pacientes aleatorizados en el Brazo 2 de Estudio se eliminarán del estudio en el momento de la progresión de la enfermedad
- Cruzamiento: Los pacientes aleatorizados en el Brazo 1 de Estudio pueden cruzarse para recibir tratamiento continuado con gemcitabina/carboplatino en combinación con 4-yodo-3-nitrobenzamida en el momento de progresión de la enfermedad
- Tamaño de la Muestra: Hasta 90 sujetos, hasta 45 en cada brazo, participan en el estudio. Los sujetos se aleatorizarán, hasta 45 en cada uno de Brazo 1 o Brazo 2.

[00242] Población de los Sujetos:

- Criterios de Inclusión:
- Al menos 18 años de edad
- Cáncer de mama metastásico (Estadio IV) con enfermedad mensurable por criterios RECIST
- 0-2 regímenes de quimioterapia anteriores en el entorno metastásico. Se permite terapia adyuvante/neoadyuvante anterior.
- La histología documenta cáncer de mama (bien primario o sitio metastásico) que es ER-negativo, PR-negativo y que no sobreexpresa HER-2 por inmunohistoquímica (0, 1) o sin amplificación génica por FISH realizado en el tumor primario o la lesión metastásica.
- Finalización de quimioterapia anterior al menos 3 semanas antes de la entrada en el estudio.
- Los pacientes pueden haber recibido terapia en el entorno adyuvante o metastásico, sin embargo si toman bisfosfonatos, las lesiones óseas pueden no usarse para progresión o respuesta.

- La terapia de radiación debe haber finalizado al menos 2 semanas antes de la entrada en el estudio, y las lesiones radiadas pueden no servir como enfermedad mensurable.
- Los pacientes pueden tener metástasis en el SNC si son estables (sin evidencia de progresión) durante al menos 3 meses después de terapia local
- Estado funcional ECOG 0-1
- Función orgánica adecuada definida como : ANC mayor de o igual a $1,5000/\text{mm}^3$, plaquetas mayor de o igual a $100.000/\text{mm}^3$, aclaramiento de creatinina mayor de 50 mL/min, ALT y AST menores de 2,5 x el límite superior normal (ULN) (O menor de 5 x ULN en el caso de metástasis en el hígado); bilirrubina total menor de 1,5 mg/dL.
- Se recomienda un bloque de tejidos disponible para los estudios de PARP, aunque no impedirá que los pacientes participen
- Las mujeres embarazadas o lactantes se excluirán. Las mujeres con potencial para tener niños deben tener un ensayo de embarazo negativo documentado en las dos semanas de la entrada en el estudio y deben estar de acuerdo con un control de la natalidad aceptable durante la duración de la terapia de estudio
- Consentimiento informado escrito firmado, aprobado por IRB

[00243] Criterios de Exclusión:

- Lesiones identificables sólo por PET
- Más de 2 regímenes de quimioterapia anteriores (incluyendo adyuvante). Regímenes secuenciales tales como AC-paclitaxel se consideran un régimen.
- Ha recibido tratamiento anterior con gemcitabina, carboplatino, cisplatino ó 4-yodo-3-nitrobenzamida.
- Condiciones médicas importantes que podrían afectar la participación en el estudio (disfunción pulmonar, renal o hepática no controlada, infección no controlada).
- Historia significativa de enfermedad cardíaca no controlada; es decir, hipertensión no controlada, angina inestable, infarto de miocardio reciente (en los 6 meses anteriores), fallo cardíaco congestivo no controlado, y cardiomiopatía que es sintomática o asintomática pero con una fracción de eyección disminuida menor de 45%.
- Otra condición comórbida significativa que el investigador piensa que podría comprometer la participación eficaz y segura en el estudio.
- Sujeto que participa en otro dispositivo investigacional de estudio de fármacos, o que está recibiendo otros agentes investigacionales

- Terapia de anticoagulación (se permiten dosis bajas para el mantenimiento del port) simultánea o anterior (en los 7 días del día 1 del estudio)
- Medicaciones concomitantes especificadas
- No se permite la terapia de radiación simultánea a lo largo del curso del estudio
- Incapacidad para cumplir con los requerimientos del estudio
- Se realizarán ensayos de cribado y evaluación sólo después de que se obtenga un consentimiento informado, firmado, escrito, aprobado por un Panel de Revisión Institucional (RB) de cada sujeto. Los procedimientos se realizarán en los 14 días de la dosificación (día 1) a no ser que se indique otra cosa.

[00244] Evaluación clínica: Historia completa, examen físico, estado ECOG, altura, peso, signos vitales, y documentación de medicaciones concomitantes.

[00245] Estudios de laboratorio: Hematología (recuento diferencial de reticulocitos, y plaquetas); tiempo de protrombina (PT) y tiempo parcial de tromboplastina (PTT); panel químico completo (sodio, potasio, cloro, CO₂, creatinina, calcio, fósforo, magnesio, BUN, ácido úrico, albúmina, AST, ALT, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, y colesterol, HDL y LDL), urinálisis con examen microscópico, inhibición de PARP en PBMC, ensayo de embarazo en suero u orina para mujeres con potencial de tener niños. El perfil de BRCA se obtendrá si se firma un consentimiento informado distinto. Esta información también puede sacarse de la historia médica de un sujeto. Estadío clínico: obtención de imágenes para enfermedad mensurable por tomografía computerizada (CT) o resonancia magnética (MRI).

[00246] Tratamiento: Los pacientes elegibles se incluirán en el estudio y se aleatorizarán en el Brazo 1 o en el Brazo 2:

- Brazo 1 de Estudio: Gemcitabina (1.000 mg/m²; 30 min infusión IV) y Carboplatino (2 AUC; 60 min infusión IV) en los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días; o
- Brazo 2 de Estudio: 4-yodo-3-nitrobenzamida (4 mg/kg, 1 hora infusión IV) en los días 1, 4, 8 y 11 de cada ciclo de 21 días.
- Cruzamiento: Los pacientes aleatorizados en el Brazo 1 de Estudio pueden cruzarse para recibir tratamiento continuado con gemcitabina/carboplatino en combinación con 4-yodo-3-nitrobenzamida en el momento de progresión de la enfermedad.
- Los ensayos predosis y postdosis se realizarán como se indica en el protocolo del estudio.
- La dosificación para ambos brazos de tratamiento se repetirá en ciclos de 21 días.

[00247] Los sujetos pueden participar en este estudio hasta que experimenten una intolerancia al fármaco o progresión de la enfermedad o consentimiento de renuncia. Los sujetos que consigan una CR recibirán 4 ciclos adicionales. Los sujetos que interrumpan el tratamiento antes de PD se someterán a evaluación regular de la estadificación por protocolo hasta el momento de PD. Una vez que un sujeto interrumpa el tratamiento, la evaluación para la supervivencia sin progresión y tasa de respuesta global continuará a intervalos de 3 meses hasta la progresión de la enfermedad o muerte.

[00248] La primera medida programada de respuesta del tumor para enfermedad mensurable se realizará después del ciclo 2, y después cada dos ciclos de terapia (aproximadamente cada 6-8 semanas) además del estadificado inicial realizado en la línea base. La respuesta del tumor según los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) modificados se usará para establecer la progresión de la enfermedad por CT o MRI (debe usarse la misma técnica usada durante el cribado).

[00249] Fin del Tratamiento: Todos los sujetos deberían tener los procedimientos de fin del tratamiento como se describe en el protocolo finalizados no más de 30 días después de la última dosis de 4-yodo-3-nitrobenzamida. Además, los sujetos tendrán la respuesta del tumor global evaluada por formación de imágenes clínicas si no se ha hecho en los 30 días anteriores a la última dosis de 4-yodo-3-nitrobenzamida.

[00250] Evaluación de Seguridad: La seguridad se evaluará por ensayos clínicos y de laboratorio estándar (hematología, química sanguínea, y urinálisis). El grado de toxicidad se define por el CTCAE v3.0 del National Cancer Institute.

Farmacocinéticas/Farmacodinámicas

[00251] Las muestras de sangre para análisis PK y farmacodinámicos se obtendrán sólo de sujetos incluidos en el brazo 2 del estudio esto incluye a los sujetos cruzados.

[00252] Las muestras de PK se recogerán durante el ciclo 1, pre dosis e inmediatamente al final de la infusión en los días 1 y 11.

[00253] Las muestras de farmacodinámica o PARP se recogerán durante el ciclo 1, pre dosis en los días 1, 4, 8 y 1. Las muestras post dosis sólo en el día 1.

[00254] Se permitirá participar en el estudio a los sitios que no pueden realizar la recogida de muestras de PK o farmacodinámica según se especifica, y el protocolo se corregirá según corresponda en esos sitios.

[00255] Eficacia: Los tumores se evaluarán por métodos estándar (pej, CT) en la línea base y aproximadamente cada 6-8 semanas después en ausencia de progresión de la enfermedad clínicamente evidente.

Métodos Estadísticos

[00256] El objetivo primario del estudio es estimar la tasa de beneficio clínico (CBR) en el brazo BA. En cada uno de los dos brazos, se estimará el punto final de eficacia primario (CBR), y se calculará el intervalo de confianza exacto binomial del 90%. Las CBR en los dos brazos se compararán usando un ensayo exacto de Fisher unilateral en el nivel de significancia del 5%. Se estimarán los puntos finales de eficacia secundarios y exploratorios de supervivencia sin progresión y supervivencia global, y se calcularán intervalos de confianza de 95% usando el método de Kaplan-Meier. Las distribuciones de supervivencia sin progresión y supervivencia global en los dos brazos se compararán usando el ensayo de rango logarítmico. Los análisis de los datos de inhibición de PARP serán de naturaleza exploratoria y descriptiva. Para el punto final de eficacia primario, se tabularán AE y eventos adversos graves (SAE) por brazo de estudio, clase de sistema orgánico, y términos preferidos. Los resultados de los ensayos de laboratorio después del primer ciclo se resumirán respecto a los desplazamientos desde los valores de la línea base.

[00257] Seguimiento: En el día 90 y cada 90 días (± 20 días) después de la última dosis del estudio se obtendrá información de seguimiento.

[00258] Evaluaciones de laboratorio -- Se prepararán muestras de sangre y de orina para hematología, química del suero, y urinálisis usando procedimientos estándar. Los paneles de laboratorio se definen como sigue:

[00259] Hematología: recuento de WBC con diferencial, recuento de RBC, hemoglobina, hematocrito, y recuento de plaquetas

[00260] Química del suero: albúmina, ALP, ALT, AST, BUN, calcio, dióxido de carbono, cloro, creatinina, γ -glutamyl transferasa, glucosa, lactato deshidrogenasa, fósforo, potasio, sodio, bilirrubina total, y proteínas totales

[00261] Urinálisis: apariencia, color, pH, gravedad específica, cetonas, proteína, glucosa, bilirrubina, nitrito, urobilinógeno, y sangre oculta (se realizará un examen microscópico del sedimento sólo si son positivos los resultados de la urinálisis con tira reactiva)

[00262] Las muestras de sangre para farmacocinética se obtendrán sólo de sujetos incluidos en el brazo 2 del estudio o cruzados en el brazo 2 del estudio. Las muestras se recogerán inmediatamente pre dosis e inmediatamente al final de cada infusión durante el ciclo 1 en los días de estudio 1 y 11.

[00263] Los biomarcadores se miden y evalúan objetivamente, indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. En oncología, existe un interés particular en los cambios moleculares que subyacen a los procesos oncogénicos que pueden identificar subtipos de cáncer, estadio de la enfermedad, evaluar la cantidad de crecimiento tumoral, o predecir la progresión de la enfermedad, metástasis, y respuestas a BA.

[00264] La actividad funcional de PARP antes y después del tratamiento de BA se determinará usando un ensayo de actividad de PARP en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC). Los PBMC se prepararán a partir de

5 mL de muestras de sangre según procedimientos descritos con detalle en el manual del estudio y se medirá la actividad/inhibición de PARP.

[00265] Referirse al manual del estudio que se proporcionará a cada sitio para los procedimientos detallados de recogida, manejo y transporte para todas las muestras de PARP.

[00266] Un ensayo génico de cáncer de mama (BRCA) es un ensayo de sangre para comprobar cambios específicos (mutaciones) en los genes (BRCA1 y BRCA2) que ayudan en el control del crecimiento celular normal. Se ha mostrado que las mujeres que tienen mutaciones en BRCA tienen entre 36% y 85% de posibilidad de desarrollar cáncer de mama y entre 16% y 60% de posibilidad de desarrollar cáncer de ovarios. La administración de un inhibidor de PARP a mujeres con una mutación BRCA puede resultar beneficiosa. Este estudio es un intento inicial para determinar cualquier asociación entre el estado de BRCA y la respuesta al tratamiento con BA.

[00267] Con el fin de lograr esto, debe determinarse el estado de BRCA (si no se conoce ya) para todos los sujetos. Un sujeto necesitará firmar un formulario consentido informado distinto. Como esto no es un criterio de inclusión para el estudio, no se excluirá la participación en este estudio de los sujetos potenciales que no están de acuerdo con este ensayo sólo por esta razón.

[0100] En cada uno de los dos brazos, se estimará el punto final de eficacia primario (CBR), y se calculará el intervalo de confianza exacto binomial del 90%. Las CBR en los dos brazos se compararán usando un ensayo exacto de Fisher unilateral en el nivel de significancia del 5%. Los puntos finales de eficacia secundarios y exploratorios de la supervivencia sin progresión y de la supervivencia global en los dos brazos se compararán usando el ensayo de rango logarítmico.

[0101] Los datos de respuesta del tumor se indicarán de manera descriptiva como listados para todos los sujetos de la población de seguridad para propósitos de determinar si el tratamiento con BA había tenido un efecto clínico mensurable (p. ej. tiempo hasta la progresión) y debería continuarse después de las primeras 8 semanas. Los datos de respuesta se categorizarán usando RECIST modificado.

[0102] El análisis de la inhibición de PARP será exploratorio según sea apropiado y de naturaleza descriptiva. Se considerarán las comparaciones estadísticas de los grupos para detectar diferencias en la

inhibición de PARP y cualquier resultado farmacogenómico (p. ej. BRCA) de las muestras tomadas antes, durante y después del tratamiento con BA.

[0103] Los análisis de seguridad se completarán para todos los sujetos que reciban al menos 1 dosis de BA.

[0104] El BA usado en el estudio se formulará en una concentración de 10 mg/mL que contiene 25% hidroxipropilbetaciclodextrina en un tampón fosfato 10 mM (pH 7,4).

Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) :

Elegibilidad

[0105] Sólo deberían incluirse en los protocolos en los que la respuesta del tumor objetiva es el punto final primario los pacientes con enfermedad mensurable en la línea base.

[0106] Enfermedad mensurable - la presencia de al menos una lesión mensurable. Si la enfermedad mensurable se restringe a una lesión solitaria, debería confirmarse su naturaleza neoplásica por citología/histología.

[0107] Lesiones mensurables - lesiones que pueden medirse de manera precisa en al menos una dimensión con el diámetro mayor ≥ 20 mm usando técnicas convencionales o ≥ 10 mm con escáner espiral CT.

[0108] Lesiones no mensurables - todas las demás lesiones, incluyendo lesiones pequeñas (diámetro mayor < 20 mm con técnicas convencionales o < 10 mm con escáner espiral CT), es decir, lesiones óseas, enfermedad leptomenígea, ascitis, efusión pleural/pericárdica, enfermedad de mama inflamatoria, linfangitis cutis/pulmonis, lesiones quísticas, y también masas abdominales que no se han confirmado y seguido por técnicas de imagen; y .

[0109] Todas las medidas deberían tomarse y registrarse en notación métrica, usando una regla o calibradores. Todas las evaluaciones en la línea base deberían realizarse tan cerca como sea posible del inicio del tratamiento y nunca más de 4 semanas antes del inicio del tratamiento.

[0110] El mismo método de evaluación y la misma técnica deberían usarse para caracterizar cada lesión identificada y notificada en la línea base y durante el seguimiento.

[0111] Las lesiones clínicas sólo se considerarán mensurables cuando son superficiales (p. ej. nódulos de la piel y nódulos linfáticos palpables). Para el caso de lesiones en la piel, se recomienda la documentación por fotografía en color, incluyendo una regla para estimar el tamaño de la lesión.

Métodos de Medida

[0112] CT y MRI son los mejores métodos disponibles actualmente y más reproducibles para medir lesiones diana seleccionadas para la evaluación de la respuesta. CT y MRI convencionales debería realizarse con cortes con un espesor de la rebanada de 10 mm contiguos. CT espiral debería realizarse usando un algoritmo de reconstrucción contiguo de 5 mm. Esto se aplica a tumores del pecho, abdomen y pelvis. Los tumores de cabeza y cuello y los de las extremidades requieren habitualmente protocolos específicos.

[0113] Las lesiones en rayos X de pecho son aceptables como lesiones mensurables cuando están claramente definidas y rodeadas por pulmón aireado. Sin embargo, se prefiere CT.

[0114] Cuando el punto final primario del estudio es evaluación objetiva de la respuesta, no deberían usarse ultrasonidos (US) para medir las lesiones tumorales. Es, sin embargo, una alternativa posible para las mediciones clínicas de nódulos linfáticos superficiales palpables, lesiones subcutáneas y nódulos tiroideos. US también podría ser útil para confirmar la desaparición completa de las lesiones superficiales habitualmente evaluada por examen clínico.

[0115] La utilización de endoscopia y laparoscopia para la evaluación objetiva del tumor no se ha validado completamente y ampliamente. Sus usos en este contexto específico requieren un equipo sofisticado y un alto nivel de habilidad técnica que puede estar disponible sólo en algunos centros. Por lo tanto, la utilización de dichas técnicas para la respuesta objetiva del tumor debería restringirse a propósitos de validación en centros

especializados. Sin embargo, dichas técnicas pueden ser útiles para confirmar la respuesta patológica completa cuando se obtienen biopsias.

[0116] Los marcadores tumorales solos no pueden usarse para evaluar una respuesta. Si los marcadores están inicialmente por encima del límite superior normal, deben normalizarse para un paciente para ser considerado en respuesta clínica completa cuando todas las lesiones han desaparecido.

[0117] La citología y la histología pueden usarse para diferenciar entre PR y CR en casos poco frecuentes (p. ej., después del tratamiento para diferenciar entre lesiones benignas residuales y lesiones malignas residuales en tipos de tumores tales como tumores de células germinales).

Documentación en la línea base de lesiones "Diana" y "No Diana"

[0118] Todas las lesiones mensurables hasta un máximo de cinco lesiones por órgano y 10 lesiones en total, representativas de todos los órganos implicados deberían identificarse como lesiones diana y registrarse y medirse en la línea base.

[0119] Las lesiones diana deberían seleccionarse tomando como base su tamaño (lesiones con el diámetro mayor) y su idoneidad para medidas repetidas precisas (bien por técnicas de imagen o clínicamente).

[0120] Una suma del diámetro mayor (LD) para todas las lesiones diana se calculará y presentará como la suma de LD en la línea base. La suma de LD de la línea base se usará como referencia con la que se caracterizará el tumor objetivo.

[0121] Todas las demás lesiones (o sitios de enfermedad) deberían identificarse como lesiones no diana y también deberían registrarse en la línea base. Las medidas de estas lesiones no se requiere, pero la presencia o ausencia de cada una debería indicarse a lo largo del seguimiento.

Criterios de Respuesta

[0122] Evaluación de lesiones diana:

- Respuesta Completa (CR): Desaparición de todas las lesiones diana
- Respuesta Parcial (PR): Al menos una disminución del 30% en la suma de LD de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de LD en la línea base
- Enfermedad Progresiva (PD): Al menos un incremento del 20% en la suma de LD de las lesiones diana, tomando como referencia la suma de LD más pequeña registrada desde que comenzó el tratamiento o la aparición de una o más lesiones nuevas
- Enfermedad Estable (SD): Bien sin suficiente encogimiento para cualificar para PR o sin suficiente incremento para cualificar para PD, tomando como referencia la suma de LD más pequeña desde que comenzó el tratamiento

[0123] Evaluación de lesiones no diana:

- Respuesta Completa (CR): Desaparición de todas las lesiones no diana y normalización del nivel del marcador tumoral
- Respuesta Incompleta/Enfermedad Estable (SD): Persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento del nivel del marcador tumoral por encima de los límites normales
- Enfermedad Progresiva (PD): Aparición de una o más lesiones nuevas y/o progresión inequívoca de lesiones no diana existentes (1)
- Aunque una progresión clara de lesiones "no diana" es sólo excepcional, en dichas circunstancias, la opinión del médico que lo

trata debería prevalecer y el estado de la progresión debería confirmarse más adelante por la comisión de revisión (o responsable del estudio).

Evaluación de la mejor respuesta global

[0124] La mejor respuesta global es la mejor respuesta registrada desde el inicio del tratamiento hasta la progresión/recurrencia de la enfermedad (tomando como referencia para PD las medidas más pequeñas registradas desde que comenzó el tratamiento). En general, la asignación de la mejor respuesta del paciente dependerá del logro tanto de los criterios de medida como de confirmación.

Lesiones diana	Lesiones no diana	Lesiones nuevas	Respuesta global
CR	CR	No	CR
CR	Respuesta incompleta/SD	No	PR
PR	No PD	No	PR
SD	No PD	No	SD
PD	Cualquiera	Sí o No	PD
Cualquiera	PD	Sí o No	PD
Cualquiera	Cualquiera	Sí	PD

[0125] Los pacientes con un deterioro global del estado de saludo que requiere la interrupción del tratamiento sin evidencia objetiva de progresión de la enfermedad en ese momento deberían clasificarse como que tienen “deterioro sintomático.” Debería hacerse todo lo posible para documentar la progresión objetiva incluso después de la interrupción del tratamiento.

[0126] En algunas circunstancias puede ser difícil distinguir la enfermedad residual del tejido normal. Cuando la evaluación de la respuesta completa depende de esta determinación, se recomienda que se investigue la lesión residual (aspiración con aguja fina//biopsia) para confirmar el estado de respuesta completa.

Confirmación

[0127] El objetivo principal de la confirmación de la respuesta objetiva es evitar la sobrestimación de la tasa de respuesta observada. En los casos en los que la confirmación de la respuesta no es factible, debería indicarse claramente cuando se presente el resultado de dichos estudios que las respuestas no se han confirmado.

[0128] Para asignarles un estado de PR o CR, las mediciones de los cambios del tumor deben confirmarse por evaluaciones repetidas que deberían realizarse no más de 4 semanas después de que se hayan cumplido por primera vez los criterios para la respuesta. También pueden ser apropiados intervalos más largos según determina el protocolo del estudio.

[0129] En el caso de SD, las mediciones del seguimiento deben haber cumplido los criterios de SD al menos una vez después de la entrada en el estudio en un intervalo mínimo (en general, no menos de 6-8 semanas) que está definido en el protocolo del estudio.

Duración de la respuesta global

[0130] La duración de la respuesta global se mide desde el momento en el que se cumplen los criterios de la medición para CR o PR (cualquiera que sea el estado que se registre en primer lugar) hasta la primera fecha en la que la recurrencia o PD se documente objetivamente, tomando como referencia para PD las mediciones más pequeñas registradas desde que comenzó el tratamiento.

Duración de la enfermedad estable

[0131] SD se mide desde el comienzo del tratamiento hasta que se cumplen los criterios para la progresión de la enfermedad, tomando como referencia las mediciones más pequeñas registradas desde que comenzó el tratamiento.

[0132] La relevancia clínica de la duración de SD varía para los diferentes tipos y grados del tumor. Por lo tanto, es altamente recomendable que el protocolo especifique el intervalo de tiempo mínimo requerido entre dos mediciones para la determinación de SD. Este intervalo de tiempo debería tener en cuenta el beneficio clínico esperado que dicho estado puede proporcionar a la población en estudio.

Revisión de la respuesta

[0133] Para los ensayos en los que la tasa de respuesta es el punto final primario es altamente recomendable que todas las respuestas se revisen por un experto o expertos independientes del estudio al finalizar el estudio. La revisión simultánea de los expedientes e imágenes radiológicas de los pacientes es el mejor método.

Presentación de los resultados

[0134] Todos los pacientes incluidos en el estudio deben evaluarse para determinar la respuesta al tratamiento, incluso si existen desviaciones importantes del protocolo del tratamiento o si no son elegibles. Cada paciente se asignará a una de las categorías siguientes: 1) respuesta completa, 2) respuesta parcial, 3) enfermedad estable, 4) enfermedad progresiva, 5) muerte temprana por enfermedad maligna, 6) muerte temprana por toxicidad, 7) muerte temprana por otra causa, o 9) desconocido (no evaluable, datos insuficientes).

[0135] Todos los pacientes que cumplen los criterios de elegibilidad deberían incluirse en el análisis principal de la tasa de respuesta. Debería considerarse que los pacientes en las categorías de respuesta 4-9 no responden al tratamiento (progresión de la enfermedad). Así, un esquema de tratamiento o administración de fármaco incorrecto no resulta en la exclusión del análisis de la tasa de respuesta. Las definiciones precisas para las categorías 4-9 serán específicas del protocolo.

Todas las conclusiones deberían basarse en todos los pacientes elegibles.

[0136] Pueden realizarse sub-análisis tomando como base un subconjunto de pacientes, excluyendo aquellos para los que se han identificado desviaciones importantes del protocolo (p. ej., muerte temprana debida a otras razones, interrupción temprana del tratamiento, violaciones importantes del protocolo, etc.). Sin embargo, estos subanálisis no pueden servir como base para sacar conclusiones respecto a la eficacia del tratamiento, y las razones para excluir pacientes del análisis deberían presentarse claramente.

[0137] Deberían proporcionarse los intervalos de confianza del 95%.

Ejemplo 6: Tratamiento de Cáncer de Mama con BA

[00268] Un estudio de fase 1b, abierto, con escalada de dosis evalúa la seguridad de BA (2,0, 2,8, 4,0, 5,6, 8,0, y 11,2 mg/kg) en combinación con regímenes quimioterapéuticos (topotecán, gemcitabina, temozolomida, y carboplatino + paclitaxel) en sujetos con tumores de mama avanzados. La evaluación de PBMC de pacientes muestra una inhibición de PARP significativa y prolongada después de una dosificación múltiple con dosis de BA de 2,8 mg/kg o mayores (Figura 3).

[00269] Se identifica una combinación de BA con cada régimen citotóxico bien tolerada. Todas las toxicidades observadas son consistentes con los efectos secundarios conocidos y esperados de cada régimen quimioterapéutico. No hay evidencia de que la adición de BA a ningún régimen citotóxico ensayado potencie toxicidades conocidas o incremente la frecuencia de sus toxicidades esperadas. Se identifica una dosis biológicamente relevante (2,8 mg/kg) que incita una inhibición de PARP significativa y mantenida a concentraciones en sangre eficaces preclínicamente. Aproximadamente el 80% de los sujetos demuestran

evidencia de enfermedad estable durante 2 ciclos de tratamiento o más, lo que indica un beneficio clínico potencial.

Ejemplo 7: Estudio de Fase 2 en Cáncer de Mama Metastásico Triple Negativo (TNBC) con BA Solo o una Combinación de BA con Gemcitabina/Carboplatino

[00270] Un ensayo de seguridad y eficacia de Fase 2, abierto, aleatorizado de 2 brazos investiga si la inhibición de la actividad de PARP combinando BA con gemcitabina/carboplatino en pacientes con cáncer de mama metastásico TNBC mejora la tasa de beneficio clínico (CBR = CR + PR + SD ≥ 6 meses) comparado con quimioterapia estándar sólo. La hipótesis que se ensaya es que la adición de BA a gemcitabina/carboplatino estará asociada con una CBR de 60% comparado con 45% conseguido con gemcitabina/carboplatino solo en sujetos con TNBC.

Puntos Finales

Puntos finales Primarios

- Tasa de Beneficio Clínico (CBR = CR+PR+SD ≥ 6 meses)
- Seguridad y tolerabilidad de BA

Puntos Finales Secundarios

- Tasa de Respuesta Global (ORR)
- Supervivencia sin progresión (PFS)

Puntos Finales Exploratorios

- Caracterización de la expresión génica de PARP y farmacogenómicas en muestras de tejidos de tumor archivadas
- Estado de BRCA
- Respuesta en sujetos con cáncer y mutaciones en BRCA conocidas comparado con sujetos sin estas mutaciones
- Clasificación del tejido de mama como basal o luminal

Dosis/Programa

Los sujetos se aleatorizan en una proporción 1:1 bien en:

Brazo 1 de Ensayo: Gemcitabina (1.000 mg/m²; 30-min infusión IV) + Carboplatino (2 AUC; 60-min infusión IV) en los días 1 y 8 de un ciclo de 21 días

Brazo 2 de Ensayo: Gemcitabina (1.000 mg/m²; 30-min infusión IV) + Carboplatino (2 AUC; 60-min infusión IV) en los días 1 y 8 + BA (5,6 mg/kg 1-hr infusión IV) en los días 1, 4, 8, y 11 de un ciclo de 21 días

Todos los ciclos de dosificación se repiten cada 21 días.

[00271] Los sujetos aleatorizados en el brazo 2 de ensayo se eliminan del estudio después de la progresión de la enfermedad. Se permite que los sujetos aleatorizados en el brazo 1 del estudio se crucen para recibir BA en combinación con gemcitabina/carboplatino después de la progresión de la enfermedad.

Criterios Clave para la Elegibilidad

- Cáncer de mama metastásico (Estadio IV) con enfermedad mensurable por RECIST
- 0-2 regímenes de quimioterapia anteriores en el entorno metastásico; se permite terapia adyuvante/neoadyuvante anterior.
- Cáncer de mama histológicamente documentado (bien primario o sitio metastásico) que es ER-negativo, PR-negativo, y que no sobreexpresa HER-2 por inmunohistoquímica (0, 1) o sin amplificación génica por FISH
- ECOG 0-1

Población de Estudio

85 pacientes se han inscrito en 23 sitios de estudio hasta la fecha (Tabla 5).

TABLA 5: Datos Demográficos de los Pacientes del Estudio de Fase II

	Brazo A: Gemcitabina/Carboplatino	Brazo B: BSI-201 + Gemcitabina/Carboplatino
n	43	42
Edad (años), media (intervalo)	51 (32-80)	54 (35-68)
Sexo		
Masculino	0 (0%)	0 (0%)
Femenino	43 (100%)	42 (100%)
Raza		
Blanca	29 (67%)	32 (76%)
Negra	8 (19%)	6 (14%)
Desconocida	6 (14%)	4 (10%)
Neoadyuvante	5	4
#regímenes anteriores de quimioterapia*	5	3
0	18	13
1	7	13
2	1	0
3		

*basado en datos disponibles

Perfil de Expresión de ER, PR, y HER2

[00272] La inclusión en el estudio se basa en ensayo histológico tradicional en el sitio de estudio. Se obtienen secciones de tejido biopsado originales incluidas en parafina de pacientes inscritos en el estudio y se caracteriza el estado de genes que son marcadores de TNBC incluyendo ER, PR, HER2, así como PARP1, Top2A, y Ki-67. El método se basa en RT-PCR multiplex cuantitativa optimizada para la evaluación cuantitativa de la expresión génica en tejido fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE). Las muestras del ensayo clínico se comparan con muestras control obtenidas independientemente que representan tejidos FFPE normales y tumorales. Además, se obtienen varias muestras de pacientes que se ha documentado que sobreexpresan HER2.

Muestras de tejido

[00273] Los especímenes se recogen como parte de un procedimiento quirúrgico normal y se congelan rápidamente en los 30 minutos posteriores a la resección. La revisión y confirmación patológica interna se realizaron en muestras sometidas a análisis. Se usan portas de vidrio teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) generados de tejidos adyacentes para confirmar y clasificar categorías diagnósticas y para evaluar la celularidad neoplásica. La expresión de ER, PR, y HER2 se determina usando inmunohistoquímica e

hibridación *in situ* con fluorescencia. Estos resultados, así como los datos de patología y clínicos concomitantes, se anotan con el inventario de la muestra y las bases de datos de gestión (bases de datos Ascenta, BioExpress; GeneLogic, Inc., Gaithersburg, MD).

Extracción de ARN y Perfiles de Expresión

[00274] La extracción e hibridación del ARN se realizan como describen Hansel et al. La calidad de la matriz de datos se evalúa usando una aplicación de matriz de alto rendimiento (Ascenta, Bioexpress Gene Logic, Gaithersburg MD y Affymetrix, Santa Clara, CA), que evalúa los datos frente a múltiples estándares objetivos incluyendo la relación 5'/3' GAPDH, relación señal/ruido, y de fondo así como otros parámetros adicionales. El análisis con GeneChip se realiza con el programa informático de bases de datos Affymetrix Microarray Analysis Suite versión 5.0, Data Mining Tool 2.0, y Microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA). Todos los genes representados en GeneChip se normalizan globalmente y se escalan a una intensidad de señal de 100.

Análisis de los Datos de Micromatriz

[00275] Para determinar la expresión basal del ARNm de PARP1 se usan muestras de tejido patológicamente normal. Se calculan la media y los límites de confianza superiores (UCL) 90%, 95%, 99%, y 99,9% para un valor individual predicho. Debido a que se está evaluando la probabilidad de que muestras individuales externas al conjunto normal estén dentro de la distribución de la línea base, se selecciona el intervalo de predicción, en lugar del intervalo de confianza para la media, para estimar el intervalo esperado para medidas individuales futuras. El intervalo de predicción se define por la fórmula, $\bar{X} \pm AS\sqrt{1 + (1/n)}$, en la que $\bar{X}$ es la media de las muestras de mama normales, S es la desviación estándar, n es el tamaño de la muestra, y A es el percentil $100(1-(p/2))^n$ de la distribución t de Student con $n-1$ grados de libertad.

Para determinar la expresión en la línea base de PARP1 se usan muestras de tejido patológicamente normal. Las muestras se agrupan en varias subcategorías según características que incluyen estadio del tumor, estado de tabaquismo, estado de CA125, o edad. Cada muestra de tumor se evalúa según UCL 90%, 95%, 99%, ó 99,9%. El análisis se realiza usando SAS v8.2 para Windows (www.sas.com). Las correlaciones de Pearson se calculan para conjuntos de 11 sondas comparados con PARP1. Las correlaciones se basan en el conjunto completo de 194 muestras. La correlación del producto-momento de Pearson se define

$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}},$$

por la fórmula,

en la que $\bar{X}$ es la media del conjunto de la sonda PARP1 y $\bar{Y}$ es la media el conjunto de la sonda con la que se está correlacionando PARP1. La

significancia estadística se determina por la fórmula, $\frac{(n-2)^{1/2} r}{(1-r^2)^{1/2}}$, en la que r es la correlación y n es el número de muestras. Se asume que el valor resultante tiene una distribución t con $n-2$ grados de libertad.

Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa Multiplex (RT-PCR):

[00276] La RT-PCR Multiplex se realiza usando 25 ng de ARN total de cada muestra como se ha descrito previamente (Khan et al., 2007). El ensayo multiplex usado para este estudio se diseña para detectar ARN de muestras incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) o de tejidos congelados. La concentración de ARN se determina usando el Kit de Cuantificación de ARN RiboGreen (Invitrogen) con un Contador Multilabel Wallac Victo r2 1420. Una muestra de ARN de cada muestra se analiza en un Bioanalizador Agilent siguiendo las instrucciones del Bioanalizador Agilent 2100. Las reacciones de transcripción inversa (RT) se realizan como se ha descrito previamente con el Applied Biosystems 9700. Las reacciones de PCR se realizan en cada ADNc con el Applied Biosystems 9700. A las reacciones de RT se añade ARN de Kanamicina para monitorizar la eficacia de las reacciones de RT y PCR. Los controles usados incluyen ARN

control positivo, un control sin molde, y un control sin transcriptasa inversa. Las reacciones de PCR se analizan por electroforesis capilar. Las reacciones de PCR marcadas con fluorescencia se diluyen, se combinan con Genome Lab size standard-400 (Beckman-Coulter,), se desnaturalizan y se ensayan con el Sistema de Análisis Genético CEQ 8800. La expresión de cada gen diana respecto a la expresión de β -glucuronidasa (GUSB) en la misma reacción se muestra como la media y la desviación estándar de 3 evaluaciones independientes para cada muestra.

[00277] La Figura 4 ilustra los resultados para los primeros 50 pacientes inscritos en el estudio. Aunque la clasificación de los pacientes como “triple negativos” se basa en los resultados de ER, PR y HER2 usando metodología clínica rutinaria, estos resultados muestran que la expresión génica de ER y PR son ambas bajas comparadas con el tejido normal. La expresión de HER2 es comparable con lo normal y distinta de los pacientes que sobreexpresan expresión génica de PARP1 que está incrementada significativamente lo que confirma nuestra observación previa.

Resultados Preliminares

Seguridad

[00278] Las reducciones de la dosis, tanto en términos de porcentaje de pacientes con reducciones como el número total de reducciones, son similares en ambos grupos (Tabla 6).

TABLA 6: Reducciones de la Dosis

	Brazo A: Gemcitabina/Carboplatino	Brazo B: BSI-201 + Gemcitabina/Carboplatino
Pacientes con reducciones de dosis, n de N (%)	15/39 (38,5%)	11/39 (28,2%)
Reducciones Totales	20	19

Reducciones gemcitabina/carboplatino, como se define por el algoritmo en el protocolo

[00279] En el brazo sólo de quimioterapia, 15 de 39 sujetos (38,9%) tienen reducciones de la dosis, y en el brazo BA + quimioterapia, 11 de 39 sujetos (28,2%) tienen reducciones de la dosis. Globalmente, hay 20 reducciones de la dosis en el grupo gemcitabina/carboplatino y 19 en el grupo BA + gemcitabina/carboplatino. Considerando que hay aproximadamente tres veces más números de dosis proporcionadas en el Brazo B comparado con el Brazo A, se fortalece más la evidencia de la seguridad de añadir BA a gemcitabina/carboplatino.

[00280] La evaluación de efectos adversos (AEs) muestra que los dos brazos del estudio son comparables (tasa de riesgo = 1,0, sin corrección para el tiempo global en estudio; Tabla 7).

TABLA 7 Efectos Adversos

Clase de Sistema Orgánico	Brazo A (Gemcitabina/Carboplatino) n = 33					Brazo B (Gem/Carb+BSI-201) n =23				
	G1	G2	G3	G4	Total	G1	G2	G3	G4	Total
Trastornos sanguíneos y del sistema linfático	1	3	12	9	25	3	2	11	4	20

Trastornos cardíacos		2			2	1				1
Trastornos del oído y del laberinto	1				1	1	1			2
Trastornos endocrinos					0	1	1			2
Trastornos oculares	2				2	5				5
Trastornos gastrointestinales	16	10	1		27	14	8			22
Trastornos generales y condiciones del sitio de administración	11	8	4		23	11	7			18
Trastornos hepatobiliares	1		1		2		1			1
Trastornos del sistema inmune		1			1	2	1			3
Infecciones e infestaciones	8	6			14	8	5			13
Daño, envenenamiento y complicaciones del procedimiento	1	3			4	1				1
Investigaciones	3	3	1		7	4	1	2		7
Trastornos del metabolismo y nutrición	10	2	2		14	4	1			5
Trastornos del tejido musculoesquelético y conectivo	9	8	2		19	6	1	1		8
Neoplasmas benignos, malignos e inespecificados (incl cists y polips)		1			1			1		1
Trastornos del sistema nervioso	5	6	3		14	8	5			13
Trastornos psiquiátricos	5	2			7	4	2			6
Trastornos renales y urinarios	4	2			6	4				4
Trastornos del sistema reproductor y de mama	2				2	1				1
Trastornos respiratorios, torácicos y	13	5	2		20	4	2			6

del mediastino										
Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo	9	6			15	7	1			8
Procedimientos quirúrgicos y médicos			1		1	2				2
Trastornos vasculares	6	2			8	2				2
TOTAL	107	70	29	9	215	93	39	15	4	151
Tasa de Riesgo										1,0

Eficacia

[00281] Los pacientes en el brazo A del estudio (gemcitabina/carboplatino sólo) parecen demostrar enfermedad progresiva mucho antes que los pacientes aleatorizados en el brazo B del estudio (gemcitabina/ carboplatino + BA). Aproximadamente el 50% de los sujetos en el Brazo A progresa al final de ciclo 2 comparado con menos del 15% de los sujetos en el Brazo B que progresa en el mismo marco de tiempo.

[00282] Se realiza un análisis estadístico formal usando datos preliminares disponibles. Este análisis muestra que los pacientes que han recibido BA en combinación con gemcitabina/carboplatino tienen una PFS media significativamente más larga, comparado con los pacientes que han recibido gemcitabina/carboplatino sólo (211 días frente a 67 días; $P < ,0001$; Figura 5).

[00283] Una evaluación preliminar de la tasa de beneficio clínico (CBR) se estima para pacientes en el estudio durante 120 y 180 días (CBR-120 y CBR-180, respectivamente), y se muestra en la Tabla 8.

TABLA 8: Evaluación Preliminar del Efecto Clínico

Punto Final	Brazo A: Gemcitabina/Carboplatino	Brazo B: Gemcitabina/Carboplatino + BSI-201	P
PFS Media	67 días	211 días	<,0001
CBR-180 ^a	5/20 (25%)	10/20 (50%)	0,1908
CBR-120 ^b	6/20 (30%)	14/20 (70%)	0,0256

^aSD (180 días) + PR+ CR, para los primeros 40 pacientes inscritos; ^bSD (120 días) + PR + CR, para los primeros 40 pacientes inscritos
La determinación de PR incluye las respuestas confirmadas y no confirmadas.

[00284] Los resultados muestran una tendencia hacia CBR mayor en el brazo gemcitabina/carboplatino + BA.

Conclusiones del Estudio Preliminar

[00285] Tomando como base los resultados presentados anteriormente, pueden alcanzarse las conclusiones siguientes para el estudio de Fase 2 de TNBC metastásico:

- Se inscriben pacientes apropiados. Los resultados del perfil genómico para los 50 pacientes iniciales inscritos indican que estos pacientes son en efecto ER- y PR-negativos y no sobreexpresan HER2, usando tanto IHC tradicional como perfil de expresión génica.
- La población de pacientes en los dos brazos del estudio es comparable.
 - o La información demográfica muestra una edad media y estado funcional similares en cada grupo.
 - o La duración de tratamiento quimioterapéutico anterior en el entorno metastásico es similar en ambos grupos. Los datos de los 69 pacientes iniciales no muestran diferencias en el pre-tratamiento en ninguno de los brazos de estudio. Más pacientes en el brazo BA reciben 2 cursos de quimioterapia anterior, lo que sugiere que estos sujetos son potencialmente más resistentes a quimioterapia que los sujetos que reciben gemcitabina/carboplatino sólo.
 - o Las reducciones de la dosis, tanto en términos de porcentaje de pacientes con reducciones como del número total de reducciones, son similares en ambos grupos. En el brazo de quimioterapia sólo, 15 de 39 sujetos (38,9%) tienen reducciones de la dosis, y en el brazo BA + quimioterapia, 11 de 39 sujetos (28,2%) tienen reducciones de la dosis. Globalmente, hay 20 reducciones de la dosis en el grupo gemcitabina/carboplatino y 19 en el grupo BA + gemcitabina/carboplatino.
 - o La tasa de AE es similar en ambos grupos, lo que apoya la conclusión de que la adición de BA a gemcitabina/carboplatino no potencia toxicidades conocidas ni causa ninguna toxicidad nueva.
- Los pacientes que han recibido BA en combinación con gemcitabina/carboplatino muestran un beneficio clínico significativo respecto a los que han recibido gemcitabina/carboplatino sólo, tomando como base un análisis provisional de supervivencia sin progresión media (211 días frente a 67 días; $P < ,0001$). Estos resultados representan una mejora significativa sobre PFS de otros estudios de TNBC metastásico.
- El análisis de la tasa de beneficio clínico en los 40 pacientes iniciales inscritos muestra una tendencia a la mejora después de la adición de BA a gemcitabina/carboplatino. Se espera que este efecto se vuelva más robusto al madurar el estudio.

Ejemplo 8: Tratamiento de Cáncer de Mama con una Combinación de Paclitaxel, Carboplatino y BA

[00286] Los pacientes tienen cáncer de mama metastásico triple negativo con progresión de la enfermedad documentada. Se requiere la confirmación histológica del tumor primario original.

[00287] Todos los pacientes tendrán enfermedad mensurable. La enfermedad mensurable se define como al menos una lesión que puede medirse de manera precisa en al menos una dimensión (mayor dimensión a registrar). Cada lesión debe ser ≥ 20 mm cuando se mide por técnicas convencionales, incluyendo palpación, rayos x comunes, CT, y MRI, o ≥ 10 mm cuando se mide por CT espiral.

[00288] Los pacientes tendrán al menos una “lesión diana” que se usará para evaluar la respuesta en este protocolo según se define por RECIST (Sección 8.1). Los tumores en un campo previamente irradiado se designarán como lesiones “no diana” a no ser que se documente la progresión o se obtenga una biopsia para confirmar la persistencia al menos 90 días después de la finalización de la terapia de radiación. Además, los pacientes deben haberse recuperado de los efectos de una cirugía, radioterapia u otra terapia reciente, y no deberían tener una infección activa que requiera antibióticos.

[00289] Cualquier terapia hormonal dirigida al tumor maligno debe interrumpirse al menos una semana antes de la inscripción. Se permite continuar con terapia de reemplazo hormonal.

[00290] Los pacientes deben tener una adecuada:

- Función de la médula ósea: Recuento de plaquetas mayor de o igual a 100.000/microlitro, y recuento de ANC mayor de o igual a 1.500/microlitro, equivalente a CTCAE v3.0 grado 1.
- Función renal: creatinina menor de o igual a 1,5 x límite superior normal (ULN) institucional, CTCAE v3.0 grado 1.
- Función hepática: Bilirrubina menor de o igual a 1,5 x ULN (CTCAE v3.0 grado 1). SGOT y fosfatasa alcalina menor de o igual a 2,5 x ULN (CTCAE v3.0 grado 1).
- Función neurológica: Neuropatía (sensorial y motora) menor de o igual a CTCAE v3.0 grado 1.
- Los pacientes con potencial de tener niños deben tener un ensayo de embarazo en suero negativo antes de la entrada en el estudio y utilizar una forma eficaz de contracepción.

[00291] Pacientes no Elegibles:

[00292] Pacientes que han recibido quimioterapia citotóxica anterior para el tratamiento de cáncer de mama.

[00293] Pacientes con una historia de otras malignidades invasivas, con la excepción de cáncer de piel no melanoma y otras malignidades específicas según se indica en las Secciones 3.23 y 3.24 se excluyen si existe cualquier evidencia de la presencia de otra malignidad en los últimos cinco años. Los pacientes también se excluyen si su tratamiento de cáncer previo está contraindicado con la terapia de este protocolo.

[00294] Los pacientes que han recibido radioterapia anterior en cualquier parte de la cavidad abdominal o pelvis DISTINTA DE la utilizada para el tratamiento de cáncer de mama en los últimos cinco años se excluyen. Se permite una radiación anterior para cáncer localizado de mama, cabeza y cuello, o piel, siempre que haya finalizado más de tres años antes de la inscripción, y que el paciente no tenga enfermedad recurrente o metastásica.

[00295] Los pacientes PUEDEN haber recibido quimioterapia adyuvante anterior para cáncer localizado de mama, siempre que haya finalizado más de tres años antes de la inscripción, y que el paciente no tenga enfermedad recurrente o metastásica.

[00296] Metástasis en el cerebro sintomáticas o no tratadas que requieren tratamiento simultáneo, incluyendo pero sin limitarse a cirugía, radiación y corticosteroides.

[00297] Infarto de miocardio (MI) en los 6 meses anteriores al día 1 del estudio, angina inestable, fallo cardíaco congestivo (CHF) >clase II de la New York Heart Association (NYHA), o hipertensión no controlada.

[00298] Historia de trastorno convulsivo o en medicación actual anti-convulsión.

MODALIDADES DEL ESTUDIO

Carboplatino (Paraplatin®, NSC # 241240)

[00299] Formulación: Carboplatino se suministra como un polvo liofilizado estéril disponible en viales de dosis única que contienen 50 mg, 150 mg y 450 mg de carboplatino para administración por infusión intravenosa. Cada vial contiene partes iguales por peso de carboplatino y manitol.

[00300] Preparación de la Disolución: Inmediatamente antes del uso, el contenido de cada vial debe reconstituirse con agua estéril para inyección, USP, 5% dextrosa en agua, o inyección 0,9% cloruro de sodio, USP, según el esquema siguiente:

[00301] Contenido	[00302] Volumen de Diluyente
--------------------------	-------------------------------------

del Vial	
[00303] 50 mg	[00304] 5 ml
[00305] 150 mg	[00306] 15 ml
[00307] 450 mg	[00308] 45 ml

- [00309] Todas estas diluciones producen una concentración de carboplatino de 10 mg/ml.
- [00310] NOTA: El aluminio reacciona con el carboplatino causando la formación de un precipitado y pérdida de potencia. Por lo tanto, las agujas o los dispositivos intravenosos que contienen partes de aluminio que pueden entrar en contacto con el fármaco no deben usarse para la preparación o administración del carboplatino.
- [00311] Almacenamiento: Los viales no abiertos de carboplatino son estables durante el tiempo indicado en el envase cuando se almacenan a temperatura ambiente controlada y se protegen de la luz.
- [00312] Estabilidad: Cuando se preparan como se dice, las disoluciones de carboplatino son estables durante ocho horas a temperatura ambiente. Como la formulación no contiene ningún conservante antibacteriano, se recomienda que las disoluciones de carboplatino se desechen ocho horas después de la dilución.
- [00313] Suministrador: Disponible comercialmente en Bristol-Myers Squibb Company.
- Paclitaxel (Taxol®, NSC #673089)*
- [00314] Formulación: Paclitaxel es un producto de plantas de *Taxus baccata* poco soluble. La solubilidad mejorada requiere un sistema de mezcla de disolventes con diluciones adicionales de 0,9% cloruro de sodio ó 5% dextrosa en agua.
- [00315] Paclitaxel se suministra como una disolución estéril concentrada, 6 mg/ml en viales de 5 ml (30 mg/vial) en aceite de ricino polioxietilado (Cremophor EL) 50% y alcohol deshidratado, USP, 50%. Los contenidos del vial deben diluirse justo antes del uso clínico. También está disponible en viales de 100 y 300 mg.
- [00316] Preparación de la Disolución: Paclitaxel, a la dosis apropiada, se diluirá en 500-1.000 ml de 0,9% Cloruro de Sodio inyección, USP ó 5% Dextrosa inyección, USP (D5W) (500 ml es adecuado si paclitaxel es un agente único). Paclitaxel debe prepararse en contenedores de vidrio o poliolefina debido al arrastre de plastificador dietilhexilftalato (DEHP) de las bolsas de cloruro de polivinilo (PVC) e intubación intravenosa por el vehículo Cremophor en el que se solubiliza el paclitaxel.
- [00317] NOTA: Se ha observado la formación de pequeñas cantidades de fibras en disolución (dentro de los límites aceptables establecidos por el Particulate Matter Test de USP para LVP) después de la preparación del paclitaxel. Por lo tanto, es necesaria la filtración en línea para la administración de disoluciones de paclitaxel. La filtración en línea debería conseguirse incorporando un filtro hidrofílico, microporoso con un tamaño de poro no mayor de 0,22 micrómetros (p. ej.: IVEX-II, IVEX-HP o equivalente) en la vía de fluido IV distal a la bomba de infusión. Aunque la formación de particulados no indica pérdida de potencia del fármaco, no deberían usarse las disoluciones que presentan una formación excesiva de materia particulada.
- [00318] Almacenamiento: Los viales intactos pueden almacenarse en un intervalo de temperatura entre 20-25 C (36-77°F) en el envase original. La congelación o refrigeración no afectarán adversamente la estabilidad del producto.
- [00319] Estabilidad: Todas las disoluciones de paclitaxel presentan una opacidad ligera directamente proporcional a la concentración de fármaco y el tiempo que transcurre después de la preparación, aunque cuando se preparan como se ha descrito anteriormente, las disoluciones de paclitaxel (0,3-1,2 mg/mL) son físicamente y químicamente estables durante 27 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) y condiciones de luz interiores.

[00320] Suministrador: Disponible comercialmente en Bristol-Myers Squibb Company.

[00321] Administración: Paclitaxel, a la dosis y dilución apropiadas, se administrará como una infusión IV continua de 3 horas. Paclitaxel se administrará a través de un dispositivo de control de la infusión (bomba) usando entubamiento y conectores que no sean de PVC, tales como los dispositivos de administración IV (polietileno o poliolefina) que se usan para infundir Nitroglicerina parenteral. No debe infundirse nada más a través de la línea por la que se administra paclitaxel. Véase la sección 5.2.

BA (4-Yodo-3-Nitrobenzamida)

[00322] BA se fabricará y envasará en nombre de BiPar Sciences y se distribuirá usando los procedimientos de distribución de fármacos de estudio clínico aprobados por BiPar. BA se presentará como un producto líquido estéril en viales de 10 mL de entrada única. BA se formula en 25% hidroxipropilbetaciclodextrina/10 mM tampón fosfato, pH 7,4 con una concentración del ingrediente activo de 10 mg/mL. Cada vial contiene no menos de 9,0 mL de volumen extraíble. La información presentada en las etiquetas para el fármaco de estudio cumplirán con los requerimientos de ICH y los de la Food and Drug Administration (FDA) de EEUU. Los viales a granel de BA se transportarán en paquetes de 10 viales por paquete y se etiquetarán con una etiqueta parcial. La etiqueta contendrá la información siguiente: La declaración cautelar para fármacos investigacionales de EEUU, número del estudio, nombre del producto, concentración, almacenamiento, fecha de reensayo, y el nombre del patrocinador del estudio.

[00323] Preparación de la Disolución: BA se preparará como se describe más adelante y se administrará por vía intravenosa durante un periodo de una hora:

[00324] Calcular la cantidad (4 mg/kg) de BA requerida para la dosificación usando el peso del sujeto en la línea base multiplicado por el nivel de dosis. Por ejemplo

[00325] Peso del sujeto en la línea base = 70 kg

[00326] Dosis = 4 mg/kg

[00327] Dosis requerida = (4 mg/kg x 70 kg) = 280 mg BA

[00328] Dividir la dosis de BA necesaria por la concentración de BA en el vial (10 mg/mL) para determinar la cantidad en mL de producto farmacéutico BA requerida para la administración. Ejemplo:

[00329] $280\text{mg} \div 10\text{ mg/mL} = 28\text{ mL}$

[00330] Calcular el número de viales de BA a 10 mL por vial para obtener el volumen requerido. (Usando este ejemplo, se necesitarían 3 viales.) Puede usarse un vial adicional si se necesita para obtener el volumen necesario de BA.

[00331] Retirar con jeringa el volumen apropiado de producto farmacéutico BA del vial y dejarlo aparte mientras se prepara la bolsa IV como sigue:

[00332] Se recomienda que haya en la bolsa IV un total de 250 mL de disolución y que se administre en un periodo de una hora. Usar una disolución IV de 0,9% NS o D5W. Si se empieza con una bolsa IV que contiene más de

250 mL de disolución, eliminar y desechar la disolución en exceso más el volumen total de producto farmacéutico que se va a añadir a la disolución. Inyectar el volumen calculado de producto farmacéutico BA en la bolsa IV y asegurar un mezclado adecuado. Unir el entubamiento IV y cebarlo con la disolución. Nota: Es aceptable usar una bolsa IV vacía e inyectar el volumen de BA según se ha calculado, y añadir 0,9% NS o 5DW para alcanzar un volumen total de 250 mL. Esto sería probablemente útil para volúmenes de BA de más de 50 mL.

[00333] Almacenamiento: Los viales del producto farmacéutico BA deben almacenarse a 2-8 °C y protegerse de la luz. Mantener los viales del producto farmacéutico en el paquete original y ponerlos en una unidad de temperatura controlada a 2-8 °C. BA puede almacenarse a 25 °C hasta durante 24 horas según se necesite. Si

se determina que BA no ha sido manipulado en estas condiciones de almacenamiento, por favor contactar con BiPar inmediatamente. No usar viales que no hayan sido almacenados en las condiciones de almacenamiento recomendadas sin autorización de BiPar.

[0100] Estabilidad: Administrar BA en las 8 horas después de la preparación. La disolución de dosificación debería mantenerse a temperatura ambiente hasta que se administra a un sujeto de estudio.

[0101] Suministrador: BiPar Sciences Inc.

PLAN DE TRATAMIENTO

[0102] Paclitaxel 175 mg/m² como una infusión de tres horas seguido de Carboplatino dosificado a una AUC = 6,0 durante 30 minutos, en el Día 1, cada 21 días más BA 4 mg/kg IV durante un periodo de infusión de una hora dos veces a la semana empezando en el Día 1 (las dosis de BA deben separarse al menos 2 días) hasta que la progresión de la enfermedad o los efectos adversos limiten más terapia. Este periodo de tiempo de tres semanas se considera un ciclo de tratamiento. El número de ciclos más allá de la respuesta clínica completa serán a discreción del médico responsable del tratamiento. Los pacientes que no cumplan los criterios para la progresión de la enfermedad (respuesta parcial o enfermedad estable) deberían seguir con el tratamiento de estudio hasta que éste se vea limitado por toxicidad.

[0103] Dosificación de Carboplatino: La dosis se calculará para alcanzar un área bajo la curva (AUC) diana de concentración x tiempo según la fórmula de Calvert usando una tasa de filtración glomerular (GFR) estimada a partir de la fórmula de Jelliffe. La dosis inicial será AUC = 6 infundido durante 30 minutos.

[0104] La dosis inicial de carboplatino debe calcularse usando GFR. En ausencia de nueva obstrucción renal u otra toxicidad renal mayor de o igual a CTCAE v3.0 grado 2 (creatinina sérica > 1,5 x ULN), la dosis de carboplatino no se recalculará para ciclos posteriores, pero se someterá a modificación de la dosis según se indica.

[0105] En pacientes con creatinina sérica anormalmente baja (menor de o igual a 0,6 mg/dl), debido a una ingesta reducida de proteínas y/o baja masa muscular, el aclaramiento de creatinina debería estimarse usando un valor mínimo de 0,6 mg/dl. Si está disponible un valor de creatinina en la línea base más apropiado en las 4 semanas de tratamiento éste también puede usarse para la estimación inicial de GFR.

[0106] Fórmula de Calvert: Dosis de Carboplatino (mg) = AUC diana × (GFR + 25).

[0107] Para los propósitos de este protocolo, la GFR se considera que es equivalente al aclaramiento de creatinina. El aclaramiento de creatinina (Ccr) se estima por el método de Jelliffe usando la fórmula siguiente: $\{98 - [0,8 (\text{edad} - 20)]\}$ Ccr = 0,9 × Scr En la que: Ccr = aclaramiento de creatinina estimado en ml/min; Edad = edad del paciente en años (de 20-80); Scr = creatinina sérica en mg/dl. En ausencia de nueva obstrucción renal o elevación de creatinina sérica por encima de 1,5 x ULN (CTCAE v3.0 grado 2), la dosis de carboplatino no se recalculará para ciclos posteriores, pero se someterá a modificación de la dosis para criterios hematológicos y otros eventos según se indica.

[0108] Método Sugerido de Administración de Quimioterapia: El régimen puede administrarse en un entorno de pacientes externos. Paclitaxel se administrará en una infusión de 3 horas seguido de carboplatino durante 30 minutos, seguido de BA durante una hora. BA se administrará por vía intravenosa (como una infusión durante un periodo de tiempo de una hora) dos veces a la semana durante la duración del estudio. Las dosis de BA deben separarse al menos 2 días (por ejemplo las dosis pueden administrarse en Lunes/Jueves, Lunes/Viernes, o Martes/Viernes). Se recomienda un régimen antiemético para el día 1 de tratamiento con paclitaxel y tratamiento con carboplatino. El régimen antiemético debería basarse en directrices de consenso revisadas. Los antieméticos profilácticos no se necesitan para dosis de BA administradas solas.

[0109] Régimen Preparativo para Paclitaxel: Paclitaxel se administrará como una infusión de 3 horas en este estudio. Para todos los ciclos en los que se va a administrar paclitaxel, se recomienda emplear un régimen

preparativo para reducir el riesgo asociado con reacciones de hipersensibilidad. Este régimen debería incluir dexametasona (bien IV o PO), anti-histamina H1 (tal como difenhidramina) y anti-histamina H2 (tal como cimetidina, ranitidina, o famotidina.)

[0110] El área de superficie corporal máxima usada para los cálculos de dosis será 2,0 m².

[0111] Si los efectos secundarios no son graves, un paciente puede permanecer en un agente de estudio indefinidamente según el criterio del investigador. Los pacientes que consigan una respuesta clínica completa pueden continuar ciclos adicionales según el criterio del médico que los trata.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

[0112] Parámetros de Respuesta – Criterios RECIST

[0113] La enfermedad mensurable se define como al menos una lesión que puede medirse de manera precisa en al menos una dimensión (mayor dimensión a registrar). Cada lesión debe ser ≥ 20 mm cuando se mide por técnicas convencionales, incluyendo palpación, rayos x comunes, CT, y MRI, o ≥ 10 mm cuando se mide por CT espiral.

[0114] Documentación en la línea base de lesiones “Diana” y “No Diana”

[0115] Todas las lesiones mensurables hasta un máximo de 5 lesiones por órgano y 10 lesiones en total, representativas de todos los órganos implicados deberían identificarse como lesiones diana y se registrarán y medirán en la línea base. Las lesiones diana deberían seleccionarse tomando como base su tamaño (lesiones con la mayor dimensión) y su idoneidad para mediciones precisas y repetitivas por un método consistente de evaluación (bien por técnicas de imagen o clínicamente). Una suma de la dimensión mayor (LD) para todas las lesiones diana se calculará y presentará como la suma de LD en la línea base. La suma de LD en la línea base se usará como referencia para caracterizar más la respuesta objetiva del tumor de la dimensión mensurable de la enfermedad.

[0116] Todas las demás lesiones (o sitios de enfermedad) deberían identificarse como lesiones no diana y también deberían presentarse en la línea base. No se requieren mediciones y estas lesiones deberían seguirse como “presentes” o “ausentes”.

[0117] Todas las evaluaciones en la línea base del estado de la enfermedad deberían realizarse tan cerca como sea posible del inicio del tratamiento y nunca más de 4 semanas antes del inicio del tratamiento.

Respuesta Mejor

[0118] Para el seguimiento se requiere la medición de la dimensión mayor del tamaño de cada lesión. El cambio en la suma de estas dimensiones permite una cierta estimación del cambio del tamaño del tumor y, por lo tanto, de la eficacia terapéutica. Todas las enfermedades deben evaluarse usando la misma técnica que en la línea base. La presentación de estos cambios en un caso individual debería hacerse en términos de la mejor respuesta conseguida por ese caso desde la entrada en el estudio.

[0119] La Respuesta Completa (CR) es desaparición de todas las lesiones diana y no diana y sin evidencia de lesiones documentadas por dos evaluaciones de la enfermedad separadas al menos 4 semanas.

[0120] La Respuesta Parcial (PR) es al menos una disminución del 30% de la suma de las dimensiones mayores (LD) de todas las lesiones diana mensurables tomando como referencia la suma de LD en la línea base. Puede no haber una progresión inequívoca de lesiones no diana y no haber nuevas lesiones. Se requiere la documentación por dos evaluaciones de la enfermedad separadas al menos 4 semanas. En el caso en el que la ÚNICA lesión diana es una masa pélvica solitaria medida por examen físico, no mensurable radiográficamente, se requiere una disminución de LD del 50%.

[0121] Enfermedad Incrementada es al menos un incremento del 20% en la suma de LD de las lesiones diana tomando como referencias la suma de LD más pequeña o la aparición de lesiones nuevas en las 8 semanas posteriores a la entrada en el estudio. La progresión inequívoca de lesiones no diana existentes,

distintas de efusiones pleurales sin prueba citológica de origen neoplásico, en la opinión del médico que la trata en las 8 semanas posteriores a la entrada en el estudio también se considera enfermedad incrementada (en esta circunstancia debe proporcionarse una explicación). En el caso en el que la ÚNICA lesión diana es una masa pélvica solitaria medida por examen físico, no mensurable radiográficamente, se requiere un incremento de LD del 50%.

[0122] Deterioro sintomático se define como un deterioro global en el estado de salud atribuible a la enfermedad que requiere un cambio en la terapia sin evidencia objetiva de progresión.

[0123] Enfermedad Estable es cualquier condición que no cumple los criterios anteriores.

[0124] Invalorable para respuesta se define como que no tiene evaluaciones del tumor repetidas después del inicio de la terapia de estudio por razones no relacionadas con síntomas o signos de la enfermedad.

[0125] Progresión (estudios de enfermedad mensurable) se define como CUALQUIERA de los siguientes:

[00334] Al menos un incremento del 20% en la suma de LD de las lesiones diana tomando como referencia la suma de LD más pequeña registrada desde la entrada en el estudio

[00335] En el caso en el que la ÚNICA lesión diana es una masa pélvica solitaria medida por examen físico que no es mensurable radiográficamente, se requiere un incremento del 50% en LD tomando como referencia el LD más pequeño registrado desde la entrada en el estudio

[00336] La aparición de una o más lesiones nuevas

[00337] Muerte debida a enfermedad antes de la documentación objetiva de progresión

[00338] Deterioro global del estado de salud atribuible a la enfermedad que requiere un cambio en la terapia sin evidencia objetiva de progresión

[00339] Progresión inequívoca de lesiones no diana existentes, distintas de efusiones pleurales sin prueba citológica de origen neoplásico, en la opinión del médico que lo trata (en esta circunstancia debe proporcionarse una explicación)

[0126] Recurrencia (estudios de la enfermedad no mensurable) se define como evidencia clínica, radiológica o histológica incrementada de enfermedad desde la entrada en el estudio.

[0127] Supervivencia es la duración de la vida observada desde la entrada en el estudio hasta la muerte o la fecha del último contacto.

[0128] Supervivencia sin Progresión (estudios de enfermedad mensurable) es el periodo desde la entrada en el estudio hasta la progresión de la enfermedad, muerte o fecha del último contacto.

[0129] Supervivencia sin Recurrencia (estudios de enfermedad no mensurable) es el periodo desde la entrada en el estudio hasta la recurrencia de la enfermedad, muerte o fecha del último contacto.

[0130] Parámetros Subjetivos incluyendo estado funcional, síntomas específicos y efectos secundarios se clasifican según CTCAE v3.0.

DURACIÓN DEL ESTUDIO

[0131] Los pacientes recibirán terapia hasta que aparezca progresión de la enfermedad o toxicidad intolerable. El paciente puede rechazar el tratamiento de estudio en cualquier momento. Los pacientes con respuesta clínica completa a la terapia continuarán en la terapia con ciclos adicionales según el criterio del médico que los trata. Los pacientes con respuesta parcial o enfermedad estable deberían continuar en la terapia a no ser que una toxicidad intolerable impida más terapia.

[0132] Todos los pacientes serán tratados (con la cumplimentación de todos los formularios requeridos de informe del caso) hasta la progresión de la enfermedad o baja del estudio. Los pacientes serán seguidos (con exámenes físicos e historias) cada tres meses durante los dos primeros años y cada seis meses durante los tres años siguientes. Los pacientes se monitorizarán para toxicidad retardada y supervivencia durante este periodo

de 5 años con formularios Q enviados al GOG Statistical and Data Center, a no ser que se retire el consentimiento.

Ejemplo 9: Combinación de 4-yodo-3-nitrobenzamida (BA) con irradiación gamma

[00340] Las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-468 se obtienen de la ATCC y se cultivan en Medio Eagle Modificado por Dulbecco con 10% de suero fetal bovino. Las células se plaquean a 10^5 células por placa de cultivo celular P100 o a 10^4 células por placa de cultivo celular P60 en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos o DMSO control. Después del tratamiento, el número de células pegadas se mide usando un contador Coulter, y por tinción con azul de metileno al 1%. El azul de metileno se disuelve en una mezcla 50%-50% de Metanol y agua. Las células se plaquean en placas de 24 ó 96 pocillos y se tratan como se ha planeado, el medio se aspira, las células se lavan con PBS, se fijan en metanol durante 5-10 min, el metanol se aspira y se deja que la placas se sequen completamente. La disolución de azul de metileno se añade a los pocillos y las placas se incuban durante 5 min. La disolución de tinción se elimina y las placas se lavan con dH₂O hasta que los lavados no son azules. Después de que las placas estén completamente secas, se añade una pequeña cantidad de 1N HCl a cada pocillo para extraer el azul de metileno. Se usan la lectura de la DO a 600nm y una curva de calibración para determinar el número de células.

[00341] Los compuestos BA se disuelven directamente de polvo seco a una disolución madre 10 mM en DMSO para cada experimento independiente. Los experimentos control se realizan con el volumen/concentración del vehículo (DMSO) equivalente; en estos controles, las células no muestran cambios en su crecimiento o distribución del ciclo celular.

[00342] Los ensayos de exclusión de PI, ciclo celular, ensayos TUNEL, y ensayos de marcaje con BrdU se realizan como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

[00343] Las células de cáncer MDA-MB-468 se tratan con irradiación gamma 3 gray con o sin 100 μ M de BA. Como se muestra en la FIG. 6, BA potencia la parada del ciclo celular en S y G2/M e incrementa el efecto antiproliferativo de la irradiación gamma en células de cáncer de mama humano triple negativo MDA-MB-468.

[0133] Aunque en la presente memoria se han mostrado y descrito realizaciones preferidas de la presente invención, será evidente para los expertos en la técnica que estas realizaciones se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. A los especialistas en la técnica se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones, sin apartarse de la invención. Debe entenderse que en la práctica de la invención pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria. Se pretende que las reivindicaciones siguientes definan el alcance de la invención y que así estén englobados los métodos y estructuras en el alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

1. El uso de (i) 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y (ii) irinotecán, en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer de seno que es negativo para un receptor de estrógeno ("RE"), receptor de progesterona ("RP") y del receptor del factor 2 de crecimiento epidérmico humano ("REH2"), en donde el medicamento es formulado por separado, de administración secuencia o simultánea de (i) y (ii).
2. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento es formulado para proveer una cantidad efectiva de (i) y (ii) para producir al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste de una reducción en el tamaño del tumor de seno, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable o una respuesta completamente patológica.
3. El uso de la reivindicación 2, en donde el efecto terapéutico resulta en una tasa de beneficio clínico comparable ($TBC = RC(\text{remisión completa}) + PR(\text{remisión parcial}) + EE(\text{enfermedad estable}) \geq 6\text{meses}$), se obtiene en comparación con el tratamiento de administración de irinotecán, sin 4-yodo-3-nitrobenzamida.
4. El uso de la reivindicación 3, en donde la tasa de beneficio clínico es mejorada aproximadamente 60% o más.
5. El uso de la reivindicación 1 a 4, en donde el cáncer de seno está en una etapa I, etapa II o etapa III.
6. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento es formulado para administración de un paciente en cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia

génica, terapia de ADN, terapia viral, terapia ARN, terapia adyuvante, terapia neoadyuvante, , inmunoterapia, nanoterapia o una combinación de las mismas.

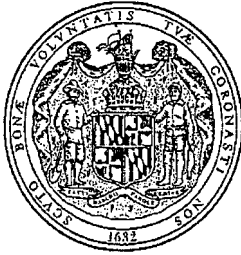
7. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento es formulado para administración a un paciente sometido a radiación gamma.
8. El uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer de seno, es un carcinoma del conducto de la infiltración.
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7-10, en donde el cáncer de seno es metastático.
10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde una cantidad efectiva de 4-yodo-3-nitrobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, es administrada.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolismo del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, e irinotecán, se proporcionan en dosis separadas y son administradas secuencialmente.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolismo del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, e irinotecán son administrados simultáneamente.
13. El método de tratar el cáncer de seno que es negativo para el receptor de estrógeno ("RE"), receptor de progesterona ("RP"), y del receptor de factor 2 del

crecimiento epidérmico humano ("REH2") en un paciente, que comprende en administrar en un paciente que presenta cáncer de seno que es negativo para RE, RP y REH2 en una cantidad efectiva de 4-yodo-3-nitrobenzamida, o un metabolito o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma e irinotecán.

14. El método de la reivindicación 13, en donde la cantidad efectiva produce al menos un efecto terapéutico seleccionado del grupo que consiste de una reducción en el tamaño del tumor de seno, reducción de la metástasis, remisión completa, remisión parcial, enfermedad estable o una respuesta completamente patológica.
15. El método de la reivindicación 13, en donde una tasa de beneficio clínico comparable ($TBC = RC(\text{remisión completa}) + PR(\text{remisión parcial}) + EE(\text{enfermedad estable}) \geq 6\text{meses}$), se obtiene en comparación con el tratamiento de administración de irinotecán, sin 4-yodo-3-nitrobenzamida.
16. El método de la reivindicación 15, en donde la mejora de la tasa de beneficio clínico es aproximadamente del 60% o más.
17. El método de la reivindicación 13, en donde el cáncer de seno está en la etapa I, en la etapa II o en la etapa III.
18. El método de la reivindicación 13, que además comprende cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia génica, terapia de ADN, terapia viral, terapia ARN, terapia adyuvante, terapia neoadyuvante, , inmunoterapia, nanoterapia o una combinación de las mismas.

19. El método de la reivindicación 13, que además comprende administrarle al paciente bajo radiación gamma.
20. El método de la reivindicación 13, en donde el cáncer de seno es un carcinoma de ducto infiltrado.
21. El método de la reivindicación 13, en donde el cáncer de seno es cáncer metastático.
22. El método de la reivindicación 13, en donde una cantidad efectiva de 4-yodo-3-nitrobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, es administrada.
23. El método de la reivindicación 13, en donde el irinotecán es administrado previo a, concomitante con, o subsecuente al 4-yodo-3-nitrobenzamida o un metabolito o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

er



The State of Maryland

Office of the 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 Robert P. Duckworth
3. acting in the capacity of Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County
4. bears the seal/stamp of the Circuit Court for Anne Arundel County

Certified

5. at Annapolis, Maryland
6. the 24th day of August, 2009
7. by The Secretary of State of Maryland
8. Seal



9. Signature

Robert P. Duckworth

Secretary of State

No. 244161

To All To Whom These Presents Shall Come
Based upon available information

US Legalization

Authenticates the signature of

Andrea L. Ryan

notarized by

Nancy J. Ingram
is true and correct

Deborah Campbell

Authorized Signature

Deborah Campbell

On this day of August 21, 2009, I Ahmad Miski, Notary Public, Anne Arundel County, State of Maryland, do hereby certify under the Oath of my Office and Seal that the signature of Deborah Campbell is true and accurate.

A. Miski
My commission expires on May 28, 2013

82285

State of Maryland, Anne Arundel County, Sect.

I, ROBERT P. DUCKWORTH, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that Ahmad Miski was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 5th day of May, 2009.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the court this 24th day of August, 2009.



Robert P. Duckworth

Robert P. Duckworth, Clerk
Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland

CAVELIER
ABOGADOS
OFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

65814-20005.48 Colombia
Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BIPAR SCIENCES, INC.

domiciliado (s) en/of 400 Oyster Point Boulevard, Suite 200,

South San Francisco, California 94080, United States of America

Hereby ratify the patent application No. 09.085.583 filed by Luz Clemencia de Páez on August 14, 2009, and,

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa.65620 y GERMAN MARIN tpa. 64239 domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 DANIEL PEÑA, tpa.65620 y GERMAN MARIN tpa. 64239 domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair

65814-20005.48 Colombia

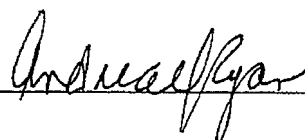
...tidades o personas, ejerzan o no jurisdicción,
...e ante las del orden administrativo, contencioso-
...ativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en
...o concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de
...tentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el
registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio,
letras comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de
dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su
renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación
voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las
acciones de competencia desleal, protección del consumidor,
oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial,
nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la
protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles,
penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados
con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos
promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados,
puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos
del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos
de agentes oficiosos.

competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to
represent me (us) before any authorities or persons, with or without
jurisdiction, specially those administrative, administrative
contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all
matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility
models and industrial designs; the registration of trademarks,
collective, defensive and service marks, slogans, commercial
names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and
denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or
domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of
use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection
to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court
cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for
writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the
civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions
and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the
above matters they may substitute this Power of Attorney,
compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel,
receive, resign, and ratify acts done by representatives without a
power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 18th day of August 2009
en/in Bridgewater, New Jersey, US

por/by ANDREA Q. RYAN, Attorney-in-Fact

Firma/Signature

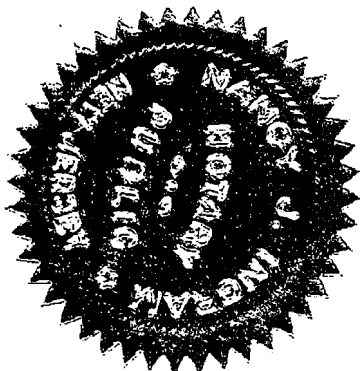


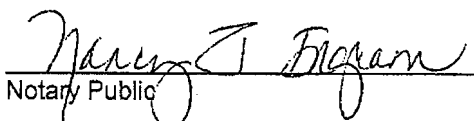
NOTARIAL CERTIFICATE
(Corporation)

UNITED STATES OF AMERICA)
STATE OF NEW JERSEY) ss.
COUNTY OF SOMERSET)

On this 18th day of August, 2009, personally appeared before me, **Andrea Q. Ryan, Attorney-in-Fact**, of **BiPar Sciences, Inc.**, known or identified to me to be the individual described in and who executed the foregoing document, **REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY**, and acknowledged the same as a free act and deed for uses and purposes therein expressed by authority of the said Corporation incorporated under the laws of the State of Delaware, United States of America.

I further certify that said authority, dated **June 30, 2009**, is based on a **Signature Authorization Form**, which I have seen, appointing the said individual Assistant Secretary with full power to sign the foregoing document on behalf of the said Corporation and that the purposes for which said document is granted are within the scope of the objects or activities of said Corporation,




Notary Public

Nancy J. Ingram
Notary Public, State of New Jersey
My Commission Expires August 2, 2014

99

TRADUCCION OFICIAL NO. 779/2009

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN 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 SE ENCUENTRAN EN EL DOCUMENTO DE REPRESENTACION Y PODER OTORGADO POR BIPAR SCIENCES, INC., DOMICILIADA EN 400 OYSTER POINT BOULEVARD, SUITE 200, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, ESTADOS UNIDOS AMERICA, POR MEDIO DEL CUAL SE RATIFICA LA SOLICITUD DE PATENTE NO. 09.085.583 RADICADA POR LUZ CLEMENCIA DE PAEZ EL 14 DE AGOSTO DE 2009 Y POR EL CUAL SE NOMBRA A LOS DOCTORES LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, DANIEL PEÑA Y GERMAN MARIN COMO REPRESENTANTES DE DICHA COMPAÑIA.

DADO Y FIRMADO EL 18 DE AGOSTO DE 2009 EN BRIDGEWATER, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA POR ANDREA Q. RYAN, APODERADO. FIRMADO: ANDREA Q. RYAN.

CERTIFICADO NOTARIAL
(CORPORACIÓN)

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

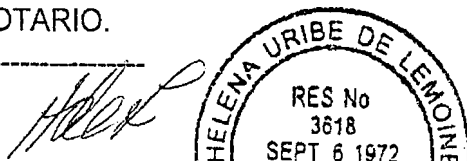
ESTADO DE NEW JERSEY - CONDADO DE SOMMERSET

Este día 18 de Agosto de 2009 personalmente compareció ante mí ANDREA Q. RYAN, Apoderado de BIPAR SCIENCES, INC., quien se identificó como la persona descrita y quien ejecutó el anterior documento de REPRESENTACION Y PODER y declaró que el mismo es su acto libre para los usos y fines allí expresados por autorización de dicha Corporación constituida bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Certifico además que la autorización, de fecha 30 de Junio de 2009, se basa en una Forma de Autorización de Firma que tuve a la vista, y por medio de la cual se nombra a dicha persona como Secretario Asistente con plenos poderes para firmar el anterior documento a nombre de dicha Corporación y que los fines para los cuales se otorga dicho documento se encuentran dentro del alcance de los objetos o actividades de dicha Corporación.

FIRMADO: NANCY J. INGRAM, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE NEW JERSEY, CON COMISION HASTA EL 2 DE AGOSTO DE 2014.

HAY SELLO DEL NOTARIO.



100

TRADUCCION OFICIAL NO. 779/2009

A TODOS A QUIENES LOS PRESENTES LLEGUEN

CON BASE EN LA INFORMACIÓN DISPONIBLE
LA OFICINA DE LEGALIZACIONES DE LOS

ESTADOS UNIDOS

AUTENTICA LA FIRMA DE

ANDREA Q. RYAN

NOTARIZADA POR

NANCY J. INGRAM

LA CUAL ES VERDADERA Y CORRECTA

FIRMADO: DEBORAH. CAMPBELL

FIRMA AUTORIZADA

ESTE DÍA 21 DE AGOSTO DE 2009, YO, AHMAD MISKI, NOTARIO
PUBLICO, PARA EL CONDADO DE ANNE ARUNDEL, ESTADO DE
MARYLAND, CERTIFICO QUE LA FIRMA DE DEBORAH A. CAMPBELL ES
VERDADERA Y CORRECTA.

FIRMADO: AHMAD MISKI, CON COMISION HASTA EL 28 DE MAYO DE
2013. HAY SELLO DEL NOTARIO.

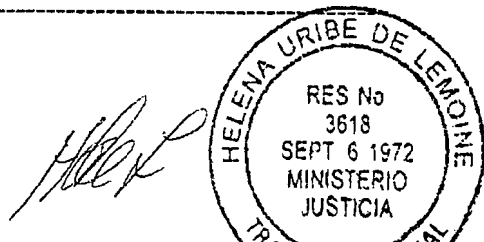
ESTADO DE MARYLAND, CONDADO DE ANNE ARUNDEL SCT NO. 82285
Yo, ROBERT P. DUCKWORTH, Oficial de la Corte de Circuito del Condado de
Anne Arundel, Maryland, una Corte de Registro, por medio del presente
certifico que **AHMAD MISKI** era Notario Público debidamente comisionado,
nombrado y calificado desde el día 5 de Mayo de 2009.

En testimonio de lo anterior firmo y pongo el sello de la corte este día 24 de
Agosto de 2009

FIRMADO: ROBERT. P. DUCKWORTH, FUNCIONARIO

CORTE DE CIRCUITO DEL CONDADO DE ANNE ARUNDEL, MARYLAND

HAY SELLO EN RELIEVE



TRADUCCION OFICIAL NO. 779/2009

ESTADO DE MARYLAND
DESPACHO DEL SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

- 1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

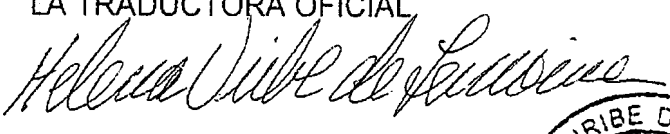
EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

- 2. HA SIDO FIRMADO POR: **ROBERT P. DUCKWORTH**
- 3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: FUNCIONARIO DE LA CORTE DE CIRCUITO DEL CONDADO DE ANNE ARUNDEL
- 4. LLEVA EL SELLO DE: DE LA CORTE DE CIRCUITO DEL CONDADO DE ANNE ARUNDEL

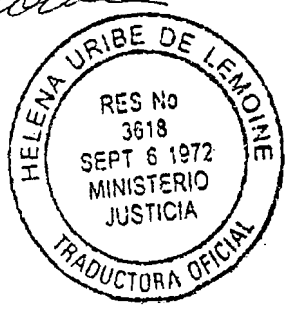
CERTIFICADO

- 5. EN: ANNAPOLIS, MARYLAND
- 6. EL 24 DE AGOSTO DE 2009
- 7. POR: EL SECRETARIO DEL ESTADO MARYLAND
- 8. BAJO EL NO.: **244161**
- 9. SELLO: DEL SECRETARIO DEL ESTADO DE MARYLAND
- 10. FIRMADO: ILEGIBLE. SECRETARIO DE ESTADO

LA TRADUCTORA OFICIAL



HELENA URIBE DE LEMOINE



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 SET 22 A 8:13

JA
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL ESTADO

956568

Helena Uribe
BOGOTÁ D.C. SE PAGA EN EL
COMPLETO DEL PRECIO
ASIGNADO INDICADO

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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0035796

Bogotá D.C., Abril 16 de 2013 - 16:50:20

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

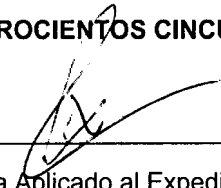
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	196871846	16/04/2013	29.281.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				\$450.000.00

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

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-070938- -00014-0000
Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 103

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-104896- -00000-0000
Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

1010-17136-841-007-1

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

, Abril 16 de 2013 - 16:50:37

703

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0037823

Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 11:50:20

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	35786	16/04/2013		330.000.00
RECIBO DE CA	999999999	35836	16/04/2013		60.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
13 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	390.000.00
			\$390.000.00

SON: **TRESCIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable. _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-070938-00014-0000

Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 103

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-104695-00000-0000

Fecha: 2013-04-24 16:10:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 103

0010-17136-841-007-1

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 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Abril 23 de 2013 - 11:50:21