

B 1



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

FASE NACIONAL - PCT

03-48134

21 EXPEDIENTE N°

54 TITULO "COMBINACIONES INMUNOTERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES"

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A 61 K 39/395, 39/385

71 SOLICITANTE CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

DOMICILIO Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, C Habana 12100, CUBA

74 APODERADO DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.

22 BOGOTA, D C.

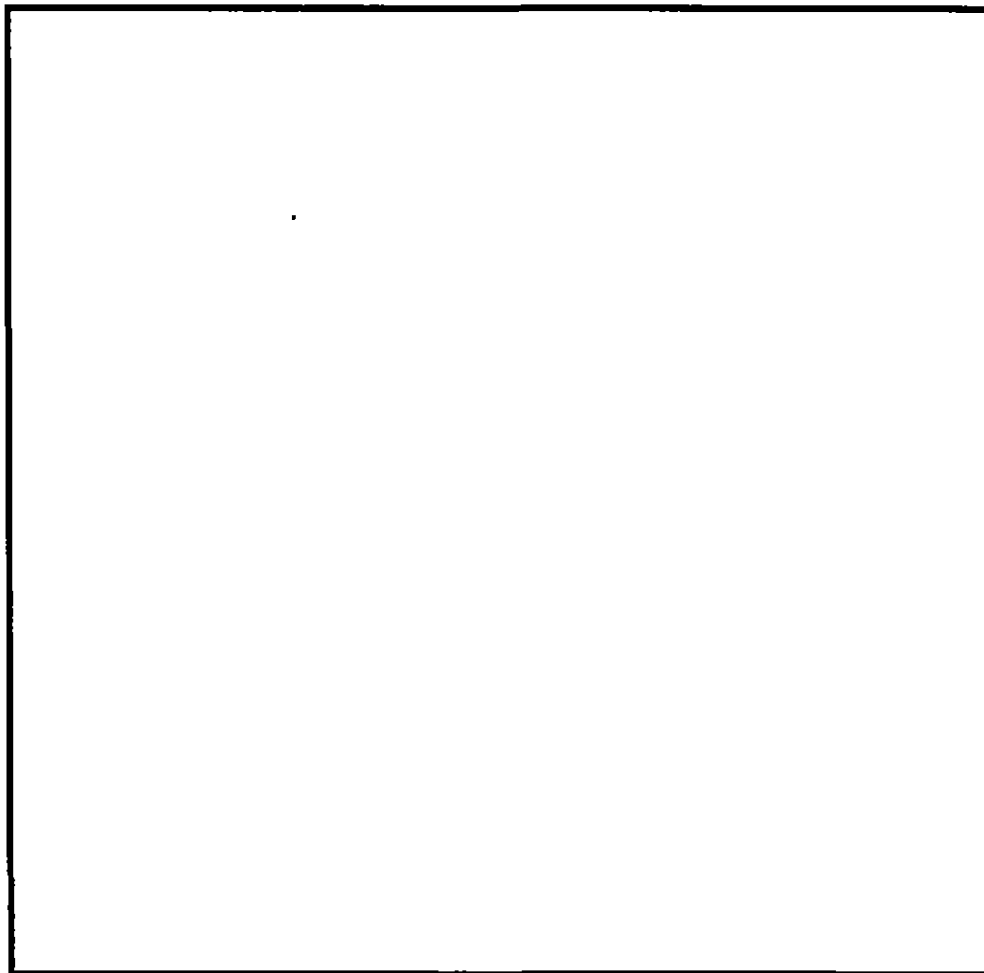
10

Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuera el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud Internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA:

C.C. No. 39.779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

6 JUN. 2003

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 93-09
Apartado 8348
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO No. 1

INVENTORES

NOMBRE

DOMICILIO

1. ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ

**Calle Juan Delgado No. 567 entre Acosta y
O'farrill, 10 de Octubre, Provincia Ciudad Habana,
CUBA**

2. GISÉLA MARIA GONZALEZ M.

**Calle 82b entre 5ta y 7ma B No. 516 bajos, Playa,
Provincia Ciudad Habana, CUBA**

3. TANIA CROMBET RAMOS

**Calle B entre 5ta y 100, Altahabana, Boyeros,
Provincia Ciudad Habana, CUBA**

4. IRENE BEAUSOLEIL DELGADO

**Calle 180 Edif. A3 Apto. 17 entre 5ta y 1ra, Flores,
Playa, Provincia Ciudad Habana, CUBA**

REPUBLICA DE COLOMBIA
Ministerio de Justicia
Indicacion : 00000134 00000000 Folios: 111
Fecha (PMB) : 2003-05-06 13:42:50
Tramite : 011 PDI-PMIENI 379 FOLIO 411 PMIENIENI
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS UNIFICACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 37,910
FECHA : MAYO 29 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
TERESA ESPINOSA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	9018695	29/05/2003	10,321,700.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
		TOTAL :	\$ 400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 93-09
Apartado 6348
Bogotá, D.C. – COLOMBIA**

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

Ref.: PODER conferido por la sociedad CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

Yo, XIMENA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pié de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, el poder que me confirió la sociedad CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, con domicilio en Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, C. Habana 12100, CUBA, debidamente legalizado por el Ministerio de Relaciones Exteriores bajo el No. 102503 el día 23 de Enero de 2001, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de Patente de Invención PCT en Fase Nacional para: "COMBINACIONES INMUNOTERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES".

Del Señor Jefe,

Acepto


**Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. 39.773.330 de Usaquén
T.P.A. No. 68.236 del C.S.J.
Carrera 9 No. 93-09 – Bogotá, D.C.
Teléfonos: 6107420 – 6107480**


**Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. 39.779.654 de Usaquén
T.P.A. No. 70.819 del C.S.J.
Carrera 9 No. 93-09 – Bogotá, D.C.
Teléfonos: 6107420 – 6107480**

**Bogotá, D.C.
XCAMCA/4873FNPCT**

**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:

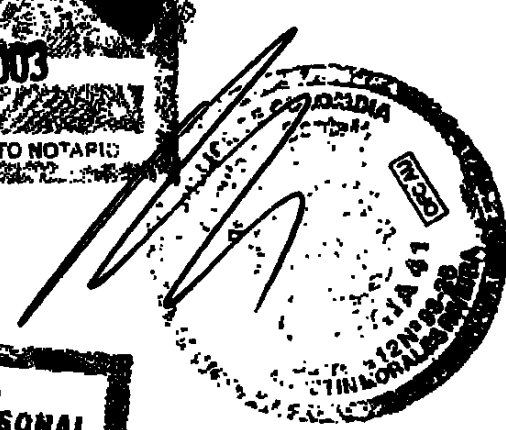
Miguel Ángel Páez
Identificado con C.C. 33.471.320
expedida en Bogotá y tarjeta profesional de abogado No. 10.108 del Consejo de la Judicatura, con documento de Superintendencia de la Policía en este escrito.

Miguel Ángel Páez
Firma del declarante

29 MAYO 2003

En Bogotá D.C. a

AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO



**AUTENTICACION DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL**
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)

Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo de esta ciudad compareció personalmente:

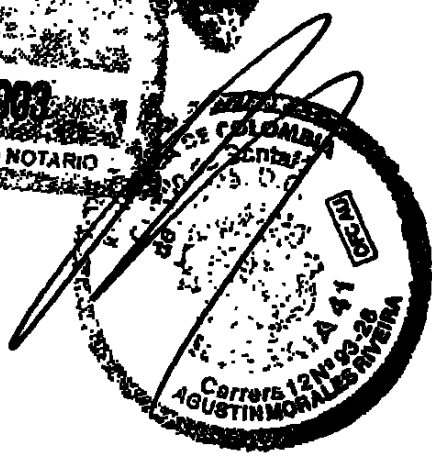
Margarita Contreras
Identificado con C.C. 33.471.320
expedida en Bogotá y tarjeta profesional de abogado No. 10.108 del Consejo de la Judicatura, con documento de Superintendencia de la Policía en este escrito.

Margarita Contreras
Firma del declarante

29 MAYO 2003

En Bogotá D.C. a

AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO



PODER

El (los) suscrito (s) Agustín Lage Dávila,
Director del CENTRO DE INMUNOLOGÍA
MOLECULAR

domiciliado (s) en Calle 216 Esq. 15, Atabey,
Playa, C. Habana 12100, Cuba.

nombra por el presente a Ximena Castellanos A. y/o
Margarita Castellanos A. abogadas con oficinas en la Carrera 9ª
No. 93-09, Bogotá - COLOMBIA para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y
con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos
representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órde-
nes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo
relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industria-
les; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas
y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseñas
comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y
cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro
de licencia de uso de esos derechos; b) acciones de oposición,
cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios
civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que
promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y
gestiones arriba determinados sustituir este mandato, transigir,
desistír, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nom-
brar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy 30 de Noviembre de 2000.

en Ciudad de la Habana, Cuba.

Por Agustín Lage Dávila

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned _____

of _____

hereby grant(s) Power of Attorney to Ximena Castellanos A. y/o
Margarita Castellanos A. attorneys residing at Carrera 9ª
No. 93-09 Bogotá - COLOMBIA to

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which
purpose we authorize the said attorneys to represent us before any
authorities or persons, specially those, administrative, administrative
contentious and judicial, in all matters concerning the following:

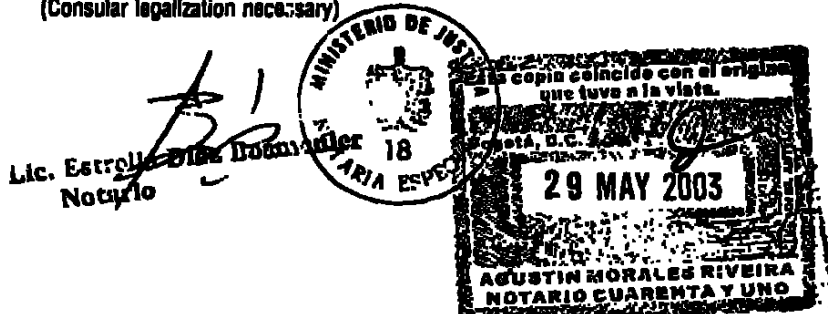
a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of
trademarks, service, collective and defensive marks, and of
designations of origin; the deposit of commercial names and emblems;
its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or
domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of
use of the above rights; b) Actions opposition, cancellation, nullity,
infringement, granting of licenses; and in general the civil, penal and
administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted
by us or against us; and that in all the above matters they may
substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel,
receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact
in or out of Court.

Given and signed this _____

In _____

By _____

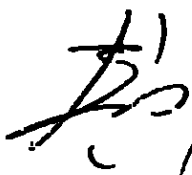
(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

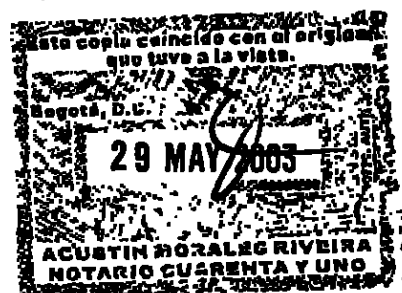


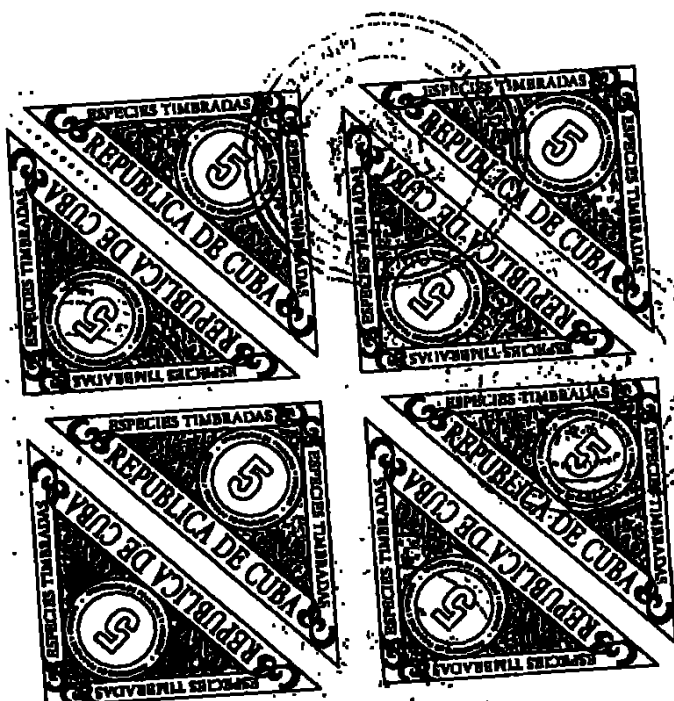
Yo, **LICENCIADA ESTRELLA DIAZ BOSMENIER**. Notaria de la
Notaria Especial del Ministerio de Justicia de la República de Cuba, con
sede en **GALE Y ASOCIADOS S.A.**, DOY FE que la firma que antecede
es la del señor **AGUSTIN BIENVENIDO LAGE DAVILA**,
ciudadano cubano, con identidad permanente número
49032207966, y es auténtica por ser la que acostumbra a usar en todos
sus actos.-----

Y para que así conste se expide en la Ciudad de la Habana, a los días 13 del
mes diciembre del 2000.-----




Lic. Estrella Díaz Bosmenier
Notario





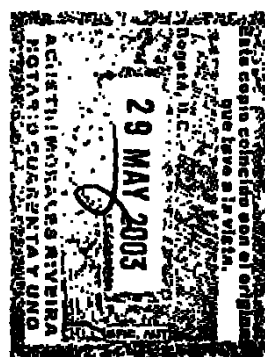
João R. Cruzes Rodrigues, Jo Manuel Capas
Ruf, Jo Marcelino de Almeida Garcia, Jo João
Pereira dos Passos Jo Maria Ciria Fernandes
Villar, Jo Eduardo Vaidão de Sá.
Funcionários autônomos do Departamento Autô-
nomo de Finanças e Contribuintes expedidos
para servir como assessores.

DECLARACION DE LA VERDAD DE LA AUTENTICIDAD DEL
 DOCUMENTO, POR EL CUAL SE DECLARA QUE
 EL DOCUMENTO ES VERDADERO Y QUE LA FIRMADA EN ESTE
 DOCUMENTO ES LA MISMA QUE LA FIRMADA EN EL DOCUMENTO A
 QUE SE LE DA FE.

SENTE CON LA
CROCE.

18 DIC. 2000

W. J. ✓





Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

No. 1/01

La Habana, Enero 3 del 2001

La suscrita Auxiliar Administrativo 5 PA, encargada de funciones consulares, visto los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

Que la Señora Maria Silvia Fernández Villar, quien como funcionaria de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que el CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR es una institución constituida según las leyes de Cuba y cumple su objeto conforme a las mismas; que Agustín Lage Dávila, quien en su carácter de Director de la citada institución confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

La Auxiliar Administrativo 5 PA, encargada de funciones consulares, no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

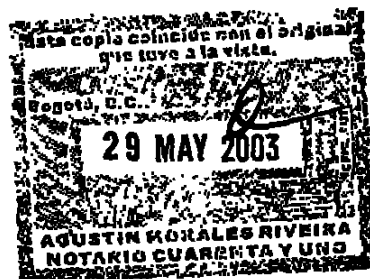


Vilma Rebeca Gálvez López
Auxiliar Administrativo 5 PA
Encargada de Funciones Consulares

PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

US\$ 7.00 (siete dólares)
US\$ 100.00 (cien dólares)
US\$ 107.00 (cientosiete dólares)



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
EMISOR

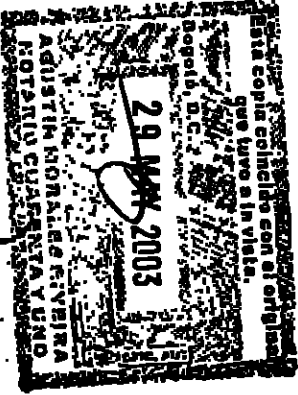
LO 233 NIT 1002

JEFE DE LEGALIDADES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

605201

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



COMBINACIONES INMUNOTERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES

Sector Técnico

La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología y más específicamente con la inmunoterapia del cáncer, particularmente con combinaciones inmunoterapéuticas y métodos de tratamiento para impedir el crecimiento de células tumorales y/o eliminar dichas células.

Técnica Anterior

El sistema del receptor de EGF (EGF-R) y sus ligandos constituye un complejo molecular cuya interacción regula de forma específica el crecimiento celular y ha sido demostrado su impacto en el crecimiento descontrolado de tumores de origen epitelial. En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracrinos y autocrinos de activación del EGF-R, esta dada tanto por la sobreproducción de los factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

El receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R, siglas en Inglés) es una glicoproteína transmembrana de 1186 aminoácidos y 170 kD de peso molecular que se encuentra ampliamente expresada en los tejidos del organismo, y ha sido implicada en varias etapas del desarrollo embrionológico. La unión de sus ligandos específicos, EGF o TGF- α , induce la dimerización del receptor así como también la heterodimerización con otros miembros de la familia ErbB, entre ellos el HER-2 (Cohen BD *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271:7620-7629). La unión de los ligandos al receptor dispara una cascada de señales intracelulares (Ullrich A and Schlessinger J (1990) *Cell* 61:203-212) que conducen al crecimiento y diferenciación de las células.

La sobreexpresión de este receptor en algunos tipos de neoplasias, fundamentalmente de origen epitelial, ha sido blanco de atención en la inmunoterapia del cáncer. Tal es el caso de tumores de mama, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, próstata y tumores de cabeza y cuello. La presencia de EGF-R ha probado ser una indicación de mal pronóstico en cáncer de mama (Pérez R *et al.* (1984) *Breast Cancer and Treatment* 4:189-193). Aún cuando no se conoce todavía el papel que juega el sistema del EGF-R y sus ligandos en la regulación del crecimiento tumoral, se ha sugerido que la expresión del EGF-R en células tumorales proporciona un mecanismo para la estimulación autocrina que conduce a

la proliferación descontrolada de dichas células (Schlessinger J *et al.* (1983) *Crit Rev Biochem* 14 (2):93-111).

Los principales ligandos de este sistema son el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor de Crecimiento Transformante de tipo alfa ($TGF\alpha$). Además, existen otros ligandos que pertenecen a la superfamilia del EGF, como son: anfiregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, epipegulina, entre otros. El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos con un peso molecular de 6045 Da, el cual resulta mitogénico para células de origen epitelial, ejerciendo su acción fundamentalmente paracrina a partir de su unión al EGF-R. El $TGF\alpha$ es un polipéptido de 50 aminoácidos, capaz de competir con el EGF por la unión al EGF-R. Anticuerpos anti-EGF no son capaces de reconocer al $TGF\alpha$ (Todaro G J *et al.* (1976), *Nature* 264:26-31), por lo que ambos factores de crecimiento son dos entidades inmunológicamente diferentes.

El sistema del EGF-R y sus ligandos ha sido utilizado como blanco de inmunoterapia pasiva (IP), mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (AMC) contra el EGF-R, en forma nativa, asociados a drogas, toxinas, o isótopos radiactivos (Vollmar AM *et al.* (1987) *J Cell Physiol* 131:418-425) en la IP de tumores con alta expresión de este receptor. Estos anticuerpos han sido seleccionados por su capacidad de inhibir la unión del EGF a su receptor (anticuerpos neutralizantes). Varios ensayos clínicos con AMC se están llevando a cabo y algunos han mostrado resultados promisorios como es el caso del ensayo clínico con el AMC C225 en cáncer de mama, de células pancreáticas y de células renales en fase II y cabeza-cuello en fase III (Mendelsohn J *et al.* (1999) American Society of Clinical Oncology Meeting). Otro ensayo clínico de Fase II con buenos resultados es el ensayo efectuado con el AMC IOR-R3 en tumores de pulmón (Crombet T *et al.* (2000) *Cancer Biotherapy and Biopharmaceutical*, manuscrito aceptado).

La Inmunoterapia pasiva con el Anticuerpo Monoclonal IOR-R3 específico contra el EGF-R, referido en la patente europea EP 586002B1, ha demostrado que la unión específica del IOR-R3 al receptor inhibe la unión del EGF al mismo, e inhibe la autofosforilación del Receptor, dependiente de EGF. A su vez, la inmunoterapia pasiva con IOR-R3 inhibió el crecimiento de células tumorales humanas en ratones desnudos, y ha disminuido la velocidad de crecimiento del tumor de algunos pacientes en ensayo clínico.

Este sistema también ha sido blanco de inmunoterapia activa específica de cáncer. Un ejemplo de ello lo constituye el uso de una vacuna que contiene uno de los principales ligandos del EGF-R, el EGF, acoplado a una proteína transportadora (US 5,894,018). Esta vacuna es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos específica contra el EGF autólogo e inhibir la unión del mismo a su receptor, bloqueando los mecanismos de proliferación desencadenados por esta unión. Estudios preclínicos han mostrado que la inmunización de ratones con EGF autólogo acoplado a una proteína transportadora en adyuvante incrementa la supervivencia de ratones transplantados con el tumor ascítico de Ehrlich (TAE) (González G *et al* (1996), *Vaccine Research* 5(4):233-243; González G *et al* (1997) *Vaccine Research* 6(2):91-100).

Con una vacuna conteniendo EGF humano recombinante se han reportado los resultados de un ensayo clínico Fase I, que demuestran la inmunogenicidad y la no-toxicidad provocada por la vacunación. (González G *et al* (1998), *Annals of Oncology* 9:1-5).

Divulgación de la invención.

En la presente invención se propone la utilización de inmunoterapias combinadas, dirigidas tanto contra el receptor con actividad quinasas en residuos de tirosina (RTK) como contra sus ligandos, con el objetivo de potenciar el efecto observado al aplicar de manera independiente las diferentes formas de inmunoterapia descritas en el estado del arte, dirigidas solo contra alguno de los componentes del sistema receptor/ligando. Esta potenciación se justifica por el bloqueo conjunto de ambos, ligandos y receptor, en un método de tratamiento que incluya ambos principios activos.

Más particularmente la invención se refiere a una combinación inmunoterapéutica para el tratamiento de tumores con efecto sobre células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK, la cual comprende la administración de forma simultánea o secuencial de A + B; ó A + C; ó A + D; ó B + C; ó B + D; ó C + D, donde A, B, C y D son:

- A.- Un anticuerpo contra un receptor RTK;
- B.- Un anticuerpo contra el(los) ligando(s) del receptor RTK;
- C.- Una vacuna cuyo principio activo es un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dicho receptor RTK;

D.- Una vacuna cuyo principio es el(los) ligando(s) de un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dichos ligando(s) del receptor RTK;

En una realización particular de la invención, el anticuerpo monoclonal contra el receptor RTK es un anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF, y más específicamente es el anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF, el hR3, depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra.

En otra materialización de la invención el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK seleccionado puede ser un anticuerpo contra el EGF o contra el TGF alfa.

10 Asimismo la invención refiere una combinación inmunoterapéutica donde el principio activo de la vacuna puede ser el receptor del EGF, el propio EGF o el TGF alfa, o un conjugado de estos principios activos con la proteína p64K de *Neisseria meningitidis*.

Igualmente la invención se refiere a un método para el control del crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK el cual comprende el tratamiento con las combinaciones terapéuticas de la invención, las cuales pueden ser aplicadas de forma simultánea o secuencial, en cuyo caso dicha aplicación de los componentes de la combinación se realiza en cualquier orden.

Las combinaciones inmunoterapéuticas de la invención impiden el crecimiento de células tumorales eliminan dichas células, mediante el bloqueo de receptores RTK y de sus ligandos. Este bloqueo puede lograrse, entre otras aproximaciones, con la combinación, tanto simultánea como secuencial de inmunoterapias activas (vacunas terapéuticas) y/o pasivas (Anticuerpos Monoclonales) dirigidas a factores de crecimiento tales como el Factor de Crecimiento Epidérmico, EGF siglas en Inglés, y el Factor de Crecimiento Transformante de tipo alfa, TGF α y sus receptores (i.e. EGF-R).

El bloqueo de los factores de crecimiento o de sus receptores provoca un efecto de detención de la proliferación celular. En esta invención se muestra como el bloqueo simultáneo tanto de ligandos como de receptores potencia el efecto inhibitorio sobre dicha proliferación celular. Este concepto terapéutico es de gran importancia en el tratamiento de tumores malignos, los cuales tienen como propiedad fundamental un incremento en la velocidad de proliferación celular.

Se describen combinaciones Inmunoterapéuticas que provocan el bloqueo de receptores RTK y/o sus ligandos, mediante la combinación de Inmunoterapia activa y/o pasiva contra los mismos.

Los procedimientos referidos pueden ser aplicados a pacientes en diferentes
5 estadios clínicos de tumores de origen epitelial que sobre-expresan el EFG-R.

La combinación de Inmunoterapia activa y pasiva puede ser simultánea o secuencial en dependencia de si el procedimiento terapéutico va a ser utilizado en pacientes con enfermedad avanzada o como terapia adyuvante.

En casos de enfermedad avanzada la combinación terapéutica propuesta es la
10 inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, en combinación con la terapia onco-específica de elección, como terapia de ataque; seguido por tratamiento de Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del
15 efecto terapéutico.

En casos de terapia adyuvante las combinaciones terapéuticas propuestas son o el tratamiento de Inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor conjuntamente con Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho
20 receptor y/o al propio receptor, o la combinación donde el tratamiento de inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, como terapia de ataque; es seguido por el tratamiento simultáneo de Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho
25 receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del efecto terapéutico.

La invención se describe más detalladamente a través de los siguientes procedimientos.

PROCEDIMIENTO 1: Combinación Inmunoterapéutica que incluye
30 **Inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y/o a ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), seguida por Inmunoterapia activa con**

vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes con tumores epiteliales en estadios avanzados.

Se administra a pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, en los cuales puede ser aplicable alguna otra forma de terapia onco-específica.

- 5 Se utiliza primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presenten la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α) , con el objetivo de efectuar una terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores.**
- 10 Dicha inmunoterapia pasiva puede administrarse combinada al tratamiento onco-específico de elección.**

Posteriormente se aplica un tratamiento de inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar un tratamiento

15 de mantenimiento para lograr mayores periodos de estabilización de la enfermedad, así como para evitar aparición de nuevos focos metastásicos.

El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango entre 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R y que tengan la propiedad de inhibir dicho receptor, y/o

20 de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre cada dosis que oscilará entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses, en combinación con la terapia onco-específica de elección. Se continuará el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

- 25 Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de inmunización con vacunas dirigidas al EFG-R ó a algún ligando del EGF-R (i.e. EGF, TGF α), unido a una proteína que funcione como transportadora (i.e. la proteína recombinante P64k de *Neisseria Meningitidis*) y administrado en un adyuvante , que pudiera ser alúmina(entre 1 y 2 mg/ dosis), Montanide ISA 51 (entre**
- 30 0.6 y 1.2 ml por dosis) u otro. Cada dosis contiene entre 50 y 800 ug del principio activo (receptor o ligando) unido a la proteína transportadora, en un volumen final de entre 0.6 y 5 mls. El esquema a utilizar es de entre 5 y 8 Inmunizaciones iniciales para Inducción de respuesta, con frecuencia que pudiera ser desde semanal hasta**

quincenal. Las inmunizaciones pueden estar precedidas de dosis de ciclofosfamida que pueden encontrarse entre 100 y 500 mg/m² de masa corporal, suministrados entre 2 y 4 días antes de la 1ra inmunización.

Las vacunas pueden estar formuladas en algún otro vehículo vacunal (i.e. liposomas,

5 vacunas ADN, vectores virales)

Las vacunas pueden formularse como productos independientes o dentro de una misma formulación vacunal.

En este período se realizarán extracciones de sangre para medición de parámetros de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el ligando o

10 receptor al que está dirigido la vacuna. Dichas extracciones se realizarán con una frecuencia que puede ser desde semanal a mensual.

Posteriormente, se realizan reinmunizaciones a la caída de los títulos, con frecuencia que pudiera ser desde mensual a trimestral, por un período de entre 1 y 2 años.

PROCEDIMIENTO 2: Combinación Inmunoterapéutica que incluye

15 **inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e. egf, tgfa), conjuntamente con inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, como tratamiento adyuvante**

20 **Se administra al paciente, inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico un tratamiento de inmunoterapia pasiva con AMC que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o a ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGFa), conjuntamente con un tratamiento activo con Vacunas que provoquen una**
25 **respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGFa).**

Estos tratamientos, administrados de forma conjunta tendrán un efecto sinérgico, logrando mayores % de regresiones y/o estabilizaciones clínicas de la enfermedad.

El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial

30 **en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango de 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses. Se**

continúa el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Conjuntamente se aplican inmunizaciones con vacunas que reconozcan ligandos y/o receptor, con igual esquema que el descrito en el procedimiento #1.

- 5 **PROCEDIMIENTO 3: Combinación Inmunoterapéutica Incluye Inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e.egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e.egf, tgfa), seguida por Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes como terapia**
10 **adyuvante.**

Se administra al paciente inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico.

- Se utiliza primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina
15 (i.e.EGF-R) y que presenten la propiedad de Inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e.EGF, TGF α) , con el objetivo de efectuar una terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores.

- Posteriormente se aplica un tratamiento de inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e.EGF-R) y/o
20 de ligandos del receptor (i.e.EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar un tratamiento de mantenimiento para lograr mayores intervalos libres de enfermedad, así como para evitar aparición de nuevos focos metastásicos.

- El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis de entre 100 y 400 mg de AMC que
25 reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar entre 1 y 24 meses. Se continuará el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

- 30 Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de Inmunización con vacunas dirigidas al EFG-R ó a algún ligando del EGF-R (i.e. EGF, TGF α), siguiendo igual esquema que el detallado en el procedimiento #1.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

Ejemplo 1: Esquema de Inmunización con Vacuna EGF utilizando alúmina como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la Inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF (US 5,894,018), usando P64 como proteína transportadora y alúmina como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 1.1 (MMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide metastásico de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:8000, con una cinética como se muestra en la Figura 1.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad hasta el mes 15. El paciente fallece a los 23.2 meses después de iniciada la vacunación

Ejemplo 2: Esquema de Inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA51 como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la Inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Montanide ISA51 como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 2.1 (AMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la
5 composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF, en un volumen total de entre 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30,
10 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA , evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

15 Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1: 32000, con una cinética como se muestra en la Figura 2.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la
20 enfermedad hasta el mes 12, en el que se diagnosticó una regresión tumoral por criterios tanto clínicos como radiológicos (Figura 3).

En el mes 14 aparece un 2^{do} tumor primario. Fallece de una complicación quirúrgica al mes 18 después de incluido en el ensayo.

Ejemplo 3: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando Alúmina como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de ciclofosfamida en pacientes con cáncer.
25

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un
30 ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 3.1, FNR, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se trató con una dosis de 100 mg/m² de superficie corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

- 5 Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.C por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

10

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

- El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF, con títulos máximos de hasta 1:8000, como se muestra en la Figura 4.
- 15

Después del inicio de la Vacunación el paciente ha mostrado una estabilización de la enfermedad hasta el mes 19.

- Ejemplo 4: Esquema de Inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA 51 como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de ciclofosfamida en pacientes con cáncer.**
- 20

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

- 25 El paciente 4.1, JPG, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, células no pequeñas, enfermedad en progresión considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se trató con una dosis de 100 mg/kg peso corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF en un volumen total de 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

30

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

10 El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:400000, como se muestra en la Figura 5.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la enfermedad hasta el mes 6

15 **Ejemplo 5: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con estabilización de la enfermedad en pacientes con cáncer.**

En un ensayo Clínico Fase I, 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, fueron tratados con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

20 En el mismo ensayo otros 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, se inmunizaron con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF, en un volumen total de entre 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide

25 Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O. por encima del doble de la media de los blancos del ensayo).

En el referido ensayo el 50% de los pacientes desarrollaron una respuesta de anticuerpos con títulos de 1:4000 o mayores (grupo GAR). En el otro 50% de los pacientes los títulos alcanzados fueron menores de 1:4000 (grupo BAR).

30 Del grupo GAR, el 87.5% mostraron una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad igual o mayor a 3 meses, después de iniciado el tratamiento.

Del grupo BAR solo el 11.1% de los pacientes mostraron una estabilización clínica o y radiológica igual o mayor a 3 meses (Tabla 1).

Estos datos demuestran la relación existente entre los niveles de respuesta de anticuerpos anti-EGF y la estabilización tumoral.

5 Tabla 1: Relación de respuesta de anticuerpos y estabilización clínica y radiológica de la enfermedad.

	% de pacientes	Estabilización de al menos 3 meses, % de pacientes
GAR	50%	87.5%
BAR	50%	11.1%

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con la sobrevida de pacientes con cáncer sometidos a dicho tratamiento.

Cuarenta pacientes de NSCLC, estadios III y IV, fueron tratados en grupos de 10 con los esquemas detallados en los ejemplos 1,2,3 y 4.

Fueron caracterizados como GAR y BAR según los criterios expuestos en el ejemplo 6.

Del total de pacientes tratados en todos los esquemas, el 50% resulta ser GAR y el 50% BAR.

15 Al hacer una comparación de las sobrevidas alcanzadas por los pacientes GAR con las alcanzadas por los pacientes BAR, resultó haber una diferencia estadísticamente significativa, con una mediana de sobrevida (SV) para GAR de 9.1 meses, y una mediana de SV para BAR de 4.5 meses ($p<0.02$). Este resultado puede observarse en la Figura 6.

20 Ejemplo 7: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente RML, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de base de lengua, etapa IV fue incluido en el ensayo clínico de uso combinado del AMC IOR-R3 y radioterapia (RTP). Recibió 6 veces la dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal. La dosis acumulada del AMC fue de 1200 mg y la dosis radiante fue de 60 Gy.

25 Al terminar la terapia combinada el paciente evidenció remisión completa del tumor primario y sus metástasis (Figura 7). Esta respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

Ejemplo 8: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente EPG, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de amígdala con adenopatías cervicales, etapa III, fue incluido en el ensayo de
5 tratamiento combinado del anticuerpo monoclonal humanizado hR3 (depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra) y RTP. Recibió 200 mg del AMC , con frecuencia semanal, durante 6 semanas, y una dosis radiante de 64 Gy. Al finalizar el tratamiento, este paciente mostró remisión completa de la lesión tumoral (figura 8) y la respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

10 **Ejemplo 9: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:**

El paciente CHA, diagnosticado como portador de tumor de amígdala, en etapa IV, con adenopatías cervicales bilaterales fue incluido en el ensayo de tratamiento combinado del hR3 y RTP. Recibió dosis de 400 mg con frecuencia semanal,
15 durante 6 semanas, para una dosis acumulada de 2400 mg. Concurrentemente recibió una dosis radiante de 64 Gy. Al finalizar el tratamiento este paciente se encontraba en remisión completa del tumor primario y las metástasis loco-regionales (Figura 9). Esta respuesta se mantiene por 12 meses.

20 **Ejemplo 10: Evaluación de combinación de terapia pasiva con anticuerpo anti-EGF-R (IOR-R3) y anticuerpo monoclonal anti-ligando del EGF-R (EGF-1) en ratones atímicos.**

Evaluación de efecto anti-tumoral en relación con las dosis administradas. Este experimento simula además el posible efecto de la administración combinada del AMC anti-EGF-R y la Vacuna EGF, ya que esta última provoca una respuesta de
25 anticuerpos anti-EGF que ejerce el mismo efecto que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales con esa especificidad, con la ventaja adicional que la respuesta de anticuerpos lograda por vacunación puede ser mantenida en el tiempo, como se puede observar en los ejemplos 1, 2 , 3 y 4, en los que se demuestra la cinética de títulos de anticuerpos en pacientes inmunizados con dicha vacuna.

30 **Sele** diferentes grupos de ratones atímicos de fondo genético NMRI (población abierta), fueron inmunizados con :

Grupo 1: 10 dosis de 0.5 mg del AMC EGF-1, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 2: 10 dosis de 1 mg AMC EGF-1, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 3: 10 dosis de 0.5 mg del AMC IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

- 5 Grupo 4: 10 dosis de 1 mg del AMC IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 5: 10 dosis de PBS, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria (control negativo).

- 10 Grupo 6: 10 dosis de la combinación de 0.5m g de EGF-1 y 0.5 mg de IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria

Grupo 7: 10 dosis de la combinación de 1m g de EGF-1 y 1 mg de IOR-R3, p r vía intraperitoneal y con frecuencia diaria

El mismo día del inicio del tratamiento se les trasplanta 1×10^6 células de la línea tumoral humana H125, que sobre-expresa el EGF-R.

- 15 Las Figuras 10 y 11 muestran los resultados obtenidos. Se produce una potenciación del efecto anti-tumoral al combinar ambos tratamientos, y el mismo se hace mayor al aumentar las dosis aplicadas.

Ejemplo 11: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF en paciente con tumor en estadio avanzado:

- 20 El paciente ARP, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, recibió un tratamiento combinado secuencial de AMC IOR-R3 y Vacuna EGF.

Recibió 6 dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal, durante 6 semanas, conjuntamente con 30 dosis de radioterapia, 5 dosis por semana por 6 semanas,

- 25 para una dosis radiante acumulada de 60 Gy.

Al finalizar el tratamiento estaba en remisión completa del tumor primario.

Un mes después de finalizado el tratamiento con el AMC, se inició un esquema de inmunización con la Vacuna EGF.

- 30 Recibió 5 dosis de 50 ug de EGF conjugado a P64, en un volumen total de 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con 0.6 ml de Montanide ISA 51 en el momento de la inmunización. Las inmunizaciones se realizaron en los días 1,7,14,21 y 51.

El paciente se mantiene en seguimiento.



Ejemplo 12: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF como terapia adyuvante:

El paciente MRM, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de pulmón, fue sometido a intervención quirúrgica.

- 5 Un mes después del acto quirúrgico, el paciente inició un tratamiento combinado simultaneando la inmunoterapia pasiva con el AMC IOR-R3 y la vacuna EGF. En la (Figura 12) se detalla el esquema de intervalos de dosificación del tratamiento recibido.

El paciente se encuentra en seguimiento.

10 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS:

Figura 1: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en paciente MMG, inmunizado según se detalla en el ejemplo 1. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

- 15 Figura 2: Cinética de respuesta de anticuerpos del paciente AMC, inmunizado según se detalla en el ejemplo 2. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

- Figura 3: Regresión tumoral observada en el paciente AMC. En la imagen de la izquierda se observa masa tumoral existente al inicio del tratamiento. En la imagen de la derecha se observa que a los 12 meses de iniciado dicho tratamiento la masa
20 tumoral había desaparecido.

Figura 4: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en el paciente FNR, Inmunizado según se detalla en el ejemplo 3. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

- Figura 5: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF del paciente JPG,
25 Inmunizado según se detalla en el ejemplo 4. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 6: La figura muestra las curvas Kaplan Meyer de los grupos de pacientes con altas respuestas anti-EGF (GAR) y con bajas respuestas anti-EGF (BAR), así como la de un grupo control histórico.

- 30 Puede observarse que los GAR presentan un incremento de sobrevida significativo comparados tanto con GAR como con los controles históricos.

Figura 7: Demostración gráfica de remisión del tumor en paciente RML, tratado como se detalla en ejemplo 7.

Figura 8: Demostración gráfica de regresión tumoral en paciente EPG tratado según se detalla en el ejemplo 8.

Figura 9: Demostración gráfica del tumor en paciente CHA, tratado como se detalla en el ejemplo 9.

- 5 Figura 10: Grupos de ratones inmunizados con 0.5 mg de cada uno de los AMC IOR-R3 , EGF-1, y con la combinación de 0.5 mg de IOR-R3 + 0.5 mg de EGF1, como se detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.**

- Figura 11: Grupos de ratones inmunizados con 1mg de cada uno de los AMC IOR-R3 , EGF-1, y con la combinación de 1 mg de IOR-R3 + 1 mg de EGF1, como se detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.**

Figura 12: Tratamiento combinado conjunto del AMC IOR-R3 y la Vacuna EGF:

- Las flechas por encima del eje de tiempo significan las fechas de administración del AMC (días 1,7,14,21,28 y 35) y las flechas por debajo del eje de tiempo significan los tiempos de las inmunizaciones con la Vacuna EGF (días 2,8,15,22,y 52).**

REIVINDICACIONES

1. Una combinación inmunoterapéutica para el tratamiento de tumores, la cual tiene efecto sobre células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores
- 5 RTK, caracterizada porque dicha combinación comprende la administración de forma simultánea o secuencial de A + B; ó A + C; ó A + D; ó B + C; ó B + D; ó C + D, donde A, B, C y D son:
 - A.- Un anticuerpo contra un receptor RTK;
 - B.- Un anticuerpo contra el(los) ligando(s) del receptor RTK;
 - 10 C.- Una vacuna cuyo principio activo es un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dicho receptor RTK;
 - D.- Una vacuna cuyo principio es el(los) ligando(s) de un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dichos ligando(s) del receptor RTK;
2. Una combinación según la reivindicación 1 donde el anticuerpo monoclonal contra
- 15 el receptor RTK es un anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF.
3. Una combinación según la reivindicación 2 donde el anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF, es un anticuerpo humanizado.
4. Una combinación según la reivindicación 3 donde el anticuerpo humanizado
- 20 contra el receptor de EGF es el hR3, depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra.
5. Una combinación según la reivindicación 1 donde el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK es un anticuerpo contra el EGF.
6. Una combinación según la reivindicación 1 donde el anticuerpo contra el ligando
- 25 del receptor RTK es un anticuerpo contra el TGF alfa.
7. Una combinación según las reivindicaciones de la 1 a la 6 donde el principio activo de la vacuna es el receptor del EGF.
8. Una combinación según las reivindicaciones de la 1 a la 6 donde el principio activo de la vacuna es el EGF.
- 30 9. Una combinación según la reivindicación 8 donde el principio activo de la vacuna comprende un conjugado entre la proteína p64K de *Neisseria meningitis* y el EGF.
10. Una combinación según las reivindicaciones de la 1 a la 6 donde el principio activo de la vacuna es el TGF alfa.

11. Una combinación según la reivindicación 10 donde la vacuna comprende como principio activo un conjugado entre la proteína p64K de *Neisseria meningitidis* y el TGF alfa.
12. Un método para el control del crecimiento y/o proliferación de células cuyo
5 crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK caracterizado porque comprende el tratamiento con una de las combinaciones terapéuticas definidas en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11.
13. Un método según reivindicación 12 caracterizado porque las combinaciones pueden ser aplicadas de forma simultánea o secuencial.
- 10 14. Un método según reivindicación 13 caracterizado porque cuando se aplican las combinaciones de forma secuencial, la aplicación de los componentes de la combinación se realiza en cualquier orden.

Figura 1:

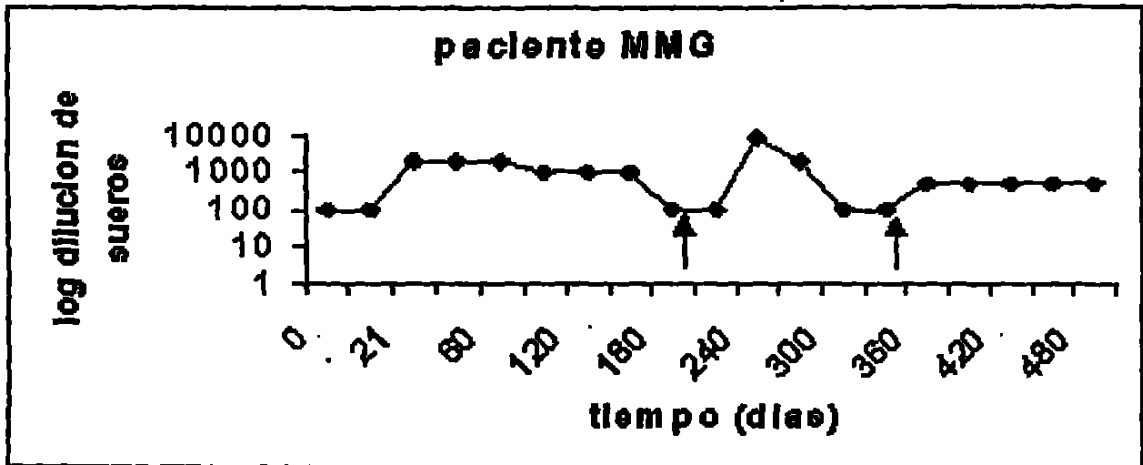


Figura 2:

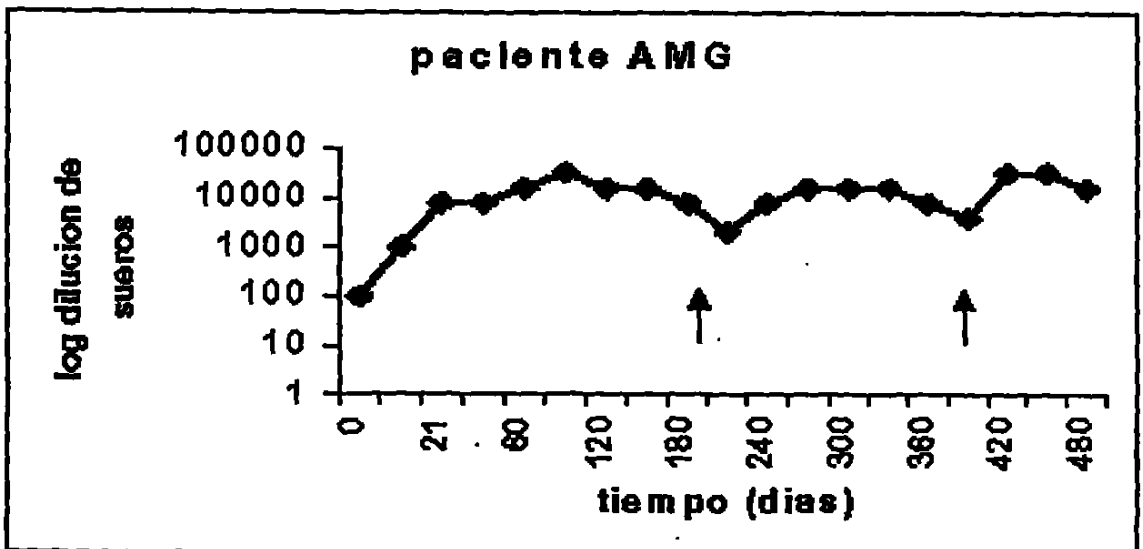


Figura 3:



Figura 4:

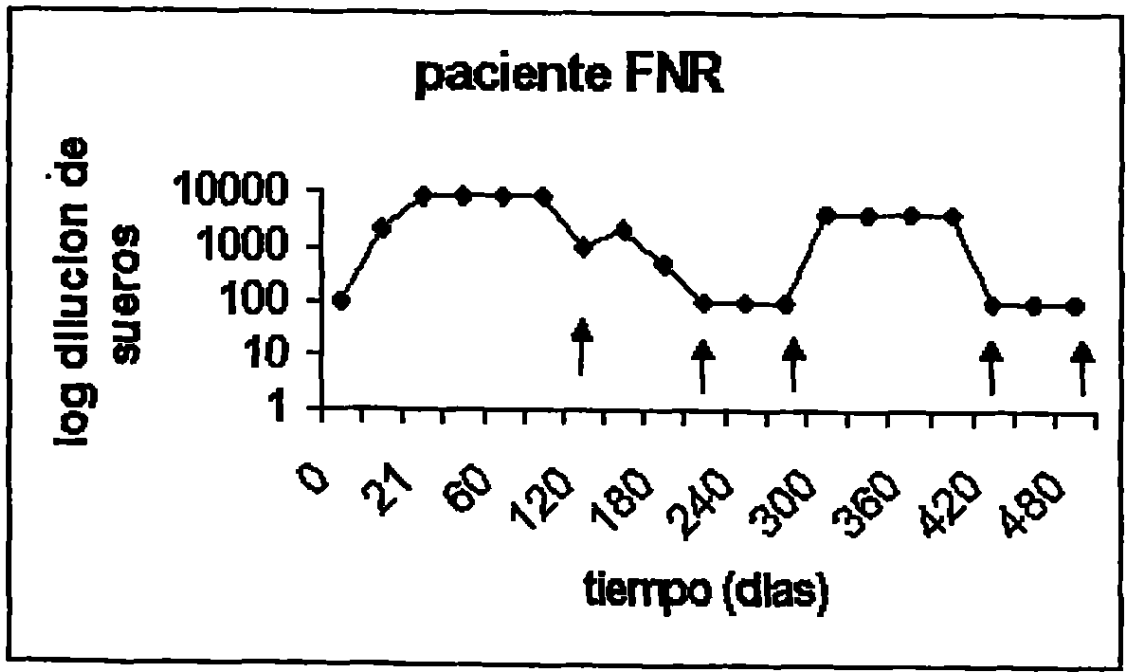


Figura 5:

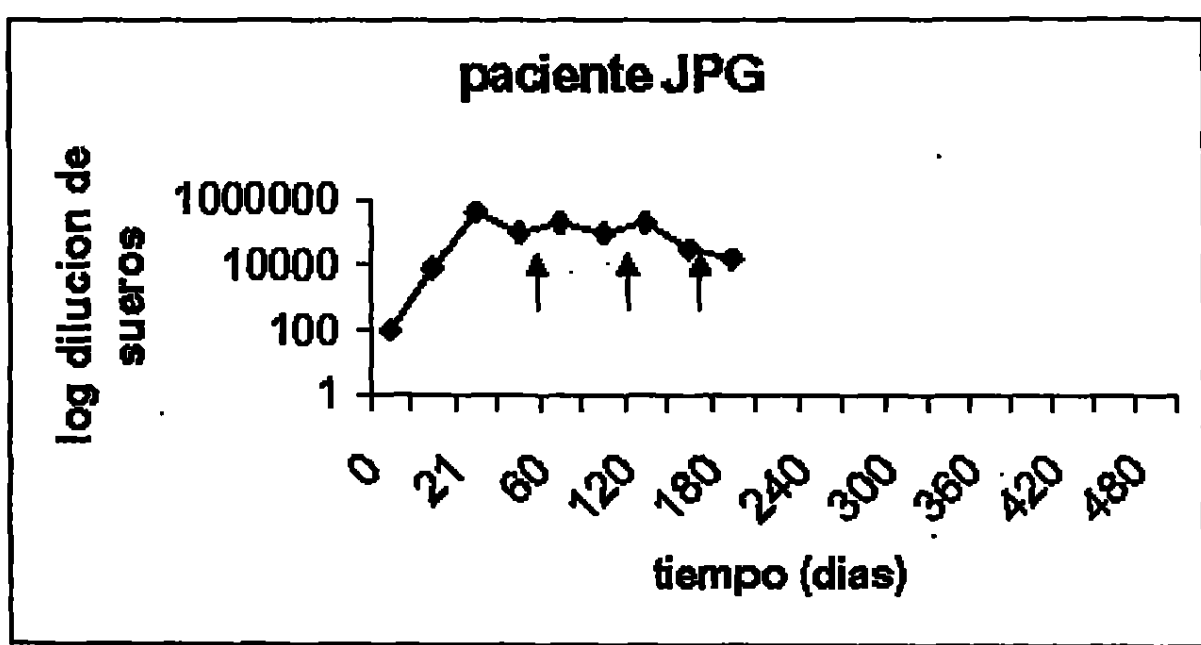


Figura 6:

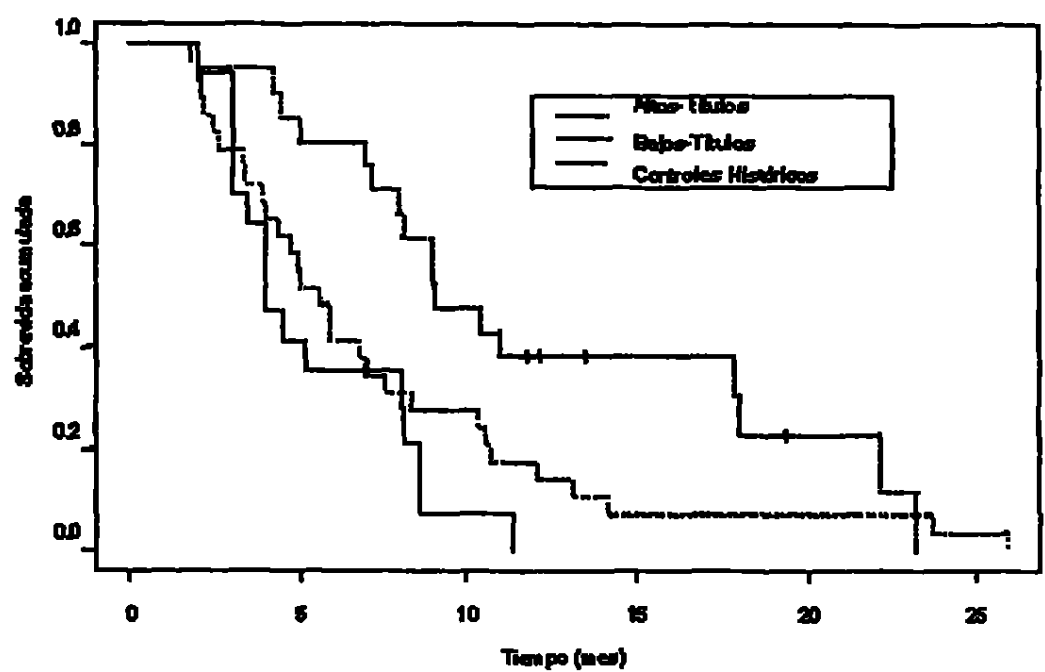


Figura 7:

Tumor (Base Base de la lengua)



Antes

Remisión completa



Después

Figura 8:

Tumor (amígdala)



Remisión completa



5/7

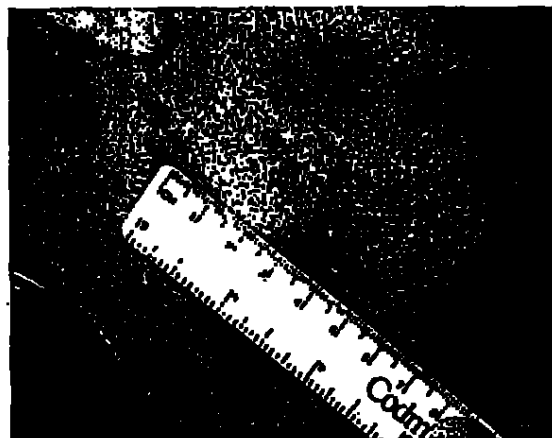
Figura 9:**Antes (tumor de amígdala y nódulo cervical)****Después (Remisión completa del tumor primario y del nódulo cervical)**

Figura 10:

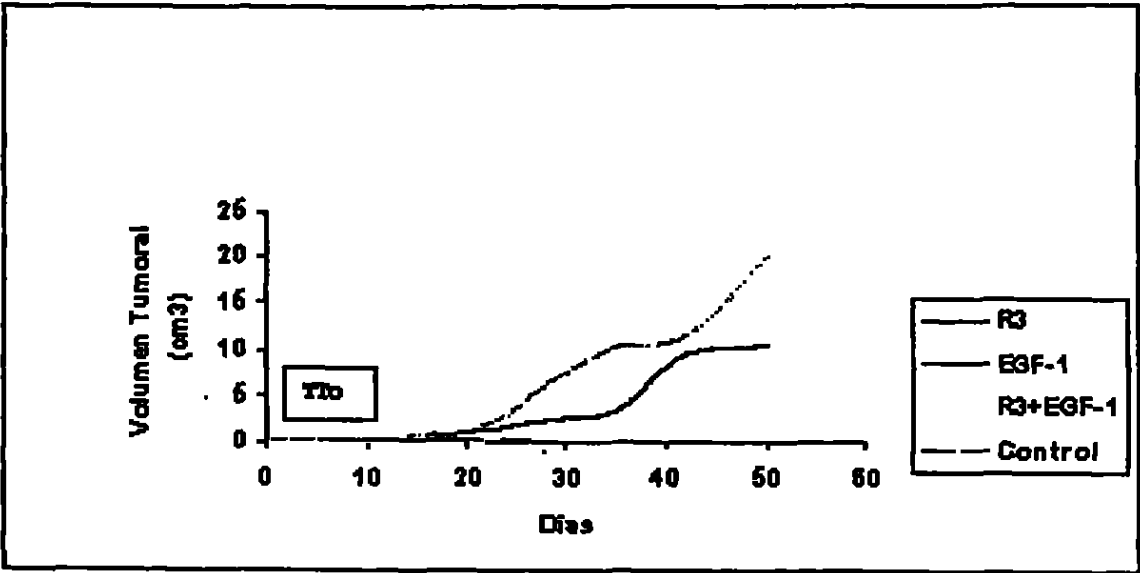


Figura 11:

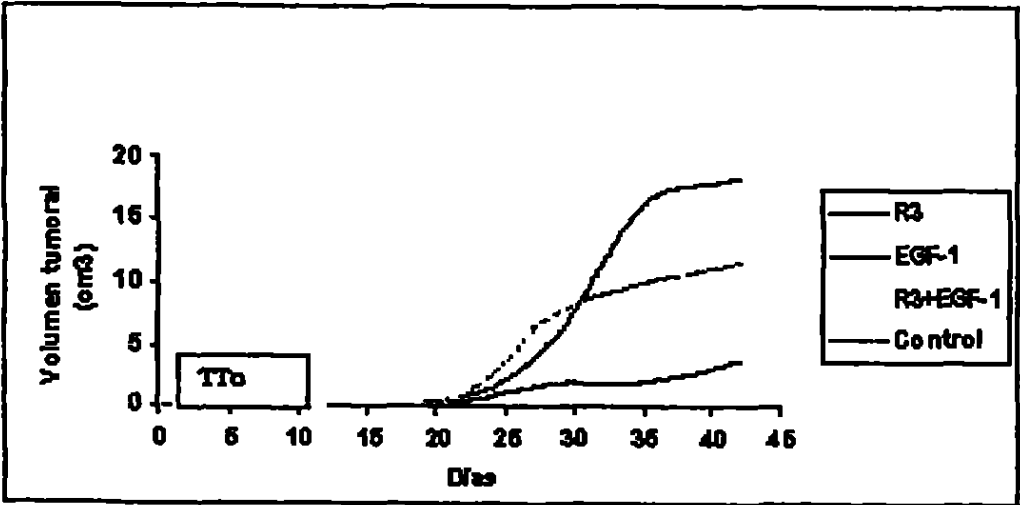


Figura 12:



COMBINACIONES INMUNOTERAPEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES

Sector Técnico

La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología y más
5 específicamente con la inmunoterapia del cáncer, particularmente con combinaciones
inmunoterapéuticas y métodos de tratamiento para impedir el crecimiento de células
tumoraes y/o eliminar dichas células.

Técnica Anterior

El sistema del receptor de EGF (EGF-R) y sus ligandos constituye un complejo
10 molecular cuya interacción regula de forma específica el crecimiento celular y ha sido
demostrado su impacto en el crecimiento descontrolado de tumores de origen epitelial.

En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracinos y
autocrinos de activación del EGF-R, esta dada tanto por la sobreproducción de los
factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

15 El receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R, siglas en Inglés) es una
glicoproteína transmembrana de 1186 aminoácidos y 170 kD de peso molecular que se
encuentra ampliamente expresada en los tejidos del organismo, y ha sido implicada en
varias etapas del desarrollo embriogénico. La unión de sus ligandos específicos, EGF o
TGF- α , induce la dimerización del receptor así como también la heterodimerización con
20 otros miembros de la familia ErbB, entre ellos el HER-2 (Cohen BD *et al.* (1996) *J Biol
Chem* 271:7620-7629). La unión de los ligandos al receptor dispara una cascada de
señales intracelulares (Ullrich A and Schlessinger J (1990) *Cell* 61:203-212) que
conducen al crecimiento y diferenciación de las células. La sobreexpresión de este
receptor en algunos tipos de neoplasias, fundamentalmente de origen epitelial, ha sido
25 blanco de atención en la inmunoterapia del cáncer. Tal es el caso de tumores de mama,

vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, próstata y tumores de cabeza y cuello. La presencia de EGF-R ha probado ser una indicación de mal pronóstico en cáncer de mama (Pérez R *et al.* (1984) *Breast Cancer and Treatment* 4:189-193). Aún cuando no se conoce todavía el papel que juega el sistema del EGF-R y sus ligandos en la
5 regulación del crecimiento tumoral, se ha sugerido que la expresión del EGF-R en células tumorales proporciona un mecanismo para la estimulación autocrina que conduce a la proliferación descontrolada de dichas células (Schlessinger J *et al.* (1983) *Crit Rev Biochem* 14 (2):93-111).

Los principales ligandos de este sistema son el Factor de Crecimiento Epidérmico
10 (EGF) y el Factor de Crecimiento Transformante de tipo alfa (TGF α). Además, existen otros ligandos que pertenecen a la superfamilia del EGF, como son: anfiregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, epiregulina, entre otros. El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos con un peso molecular de 6045 Da, el cual resulta mitogénico para células de origen epitelial, ejerciendo su acción
15 fundamentalmente paracrina a partir de su unión al EGF-R. El TGF α es un polipéptido de 50 aminoácidos, capaz de competir con el EGF por la unión al EGF-R. Anticuerpos anti-EGF no son capaces de reconocer al TGF α (Todaro G J *et al.* (1976), *Nature* 264:26-31), por lo que ambos factores de crecimiento son dos entidades inmunológicamente diferentes.

20 El sistema del EGF-R y sus ligandos ha sido utilizado como blanco de inmunoterapia pasiva (IP), mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (AMC) contra el EGF-R, en forma nativa, asociados a drogas, toxinas, o isótopos radiactivos (Vollmar AM *et al.* (1987) *J Cell Physiol* 131:418-425) en la IP de tumores con alta expresión de este receptor. Estos anticuerpos han sido seleccionados por su capacidad de inhibir la unión
25 del EGF a su receptor (anticuerpos neutralizantes). Varios ensayos clínicos con AMC se

están llevando a cabo y algunos han mostrado resultados promisorios como es el caso del ensayo clínico con el AMC C225 en cáncer de mama, de células pancreáticas y de células renales en fase II y cabeza-cuello en fase III (Mendelsohn J *et al.* (1999) American Society of Clinical Oncology Meeting). Otro ensayo clínico de Fase II con
5 buenos resultados es el ensayo efectuado con el AMC IOR-R3 en tumores de pulmón (Crombet T *et al.* (2000) *Cancer Biotherapy and Biopharmaceutical*, manuscrito aceptado).

La inmunoterapia pasiva con el Anticuerpo Monoclonal IOR-R3 específico contra el EGF-R, referido en la patente europea EP 586002B1, ha demostrado que la unión
10 específica del IOR-R3 al receptor inhibe la unión del EGF al mismo, e inhibe la autofosforilación del Receptor, dependiente de EGF. A su vez, la inmunoterapia pasiva con IOR-R3 inhibió el crecimiento de células tumorales humanas en ratones desnudos, y ha disminuido la velocidad de crecimiento del tumor de algunos pacientes en ensayo clínico.

15 Este sistema también ha sido blanco de inmunoterapia activa específica de cáncer. Un ejemplo de ello lo constituye el uso de una vacuna que contiene uno de los principales ligandos del EGF-R, el EGF, acoplado a una proteína transportadora (US 5,894,018). Esta vacuna es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos específica contra el EGF autólogo e inhibir la unión del mismo a su receptor, bloqueando los mecanismos de
20 proliferación desencadenados por esta unión. Estudios preclínicos han mostrado que la inmunización de ratones con EGF autólogo acoplado a una proteína transportadora en adyuvante incrementa la supervivencia de ratones transplantados con el tumor ascítico de Ehrlich (TAE) (González G *et al.* (1996), *Vaccine Research* 5(4):233-243; González G *et al.* (1997) *Vaccine Research* 6(2):91-100).

Con una vacuna conteniendo EGF humano recombinante se han reportado los resultados de un ensayo clínico Fase I, que demuestran la inmunogenicidad y la no-toxicidad provocada por la vacunación. (González G *et al* (1998), *Annals of Oncology* 9:1-5).

5 Divulgación de la invención.

En la presente invención se propone la utilización de inmunoterapias combinadas, dirigidas tanto contra el receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (RTK) como contra sus ligandos, con el objetivo de potenciar el efecto observado al aplicar de manera independiente las diferentes formas de inmunoterapia descritas en el estado del
10 arte, dirigidas solo contra alguno de los componentes del sistema receptor/ligando. Esta potenciación se justifica por el bloqueo conjunto de ambos, ligandos y receptor, en un método de tratamiento que incluya ambos principios activos.

Más particularmente la invención se refiere a una combinación inmunoterapéutica para el tratamiento de tumores con efecto sobre células cuyo crecimiento es dependiente del
15 sistema de receptores RTK, la cual comprende la administración de forma simultánea o secuencial de A + B; ó A + C; ó A + D; ó B + C; ó B + D; ó C + D, donde A, B, C y D son:

- A.- Un anticuerpo contra un receptor RTK;
- B.- Un anticuerpo contra el(los) ligando(s) del receptor RTK;
- 20 C.- Una vacuna cuyo principio activo es un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dicho receptor RTK;
- D.- Una vacuna cuyo principio es el(los) ligando(s) de un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dichos ligando(s) del receptor RTK;

En una realización particular de la invención, el anticuerpo monoclonal contra el receptor
25 RTK es un anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF, y

más específicamente es el anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF, el hR3, depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra.

En otra materialización de la invención el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK seleccionado puede ser un anticuerpo contra el EGF o contra el TGF alfa.

- 5 Asimismo la invención refiere una combinación inmunoterapéutica donde el principio activo de la vacuna puede ser el receptor del EGF, el propio EGF o el TGF alfa, o un conjugado de estos principios activos con la proteína p64K de *Neisseria meningitis*.

Igualmente la invención se refiere a un método para el control del crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK

- 10 el cual comprende el tratamiento con las combinaciones terapéuticas de la invención, las cuales pueden ser aplicadas de forma simultánea o secuencial, en cuyo caso dicha aplicación de los componentes de la combinación se realiza en cualquier orden.

Las combinaciones inmunoterapéuticas de la invención impiden el crecimiento de células tumorales eliminan dichas células, mediante el bloqueo de receptores RTK y de

- 15 sus ligandos. Este bloqueo puede lograrse, entre otras aproximaciones, con la combinación, tanto simultánea como secuencial de inmunoterapias activas (vacunas terapéuticas) y/o pasivas (Anticuerpos Monoclonales) dirigidas a factores de crecimiento tales como el Factor de Crecimiento Epidérmico, EGF siglas en Inglés, y el Factor de Crecimiento Transformante de tipo alfa, $TGF\alpha$ y sus receptores (i.e. EGF-R).

- 20 El bloqueo de los factores de crecimiento o de sus receptores provoca un efecto de detención de la proliferación celular. En esta invención se muestra como el bloqueo simultáneo tanto de ligandos como de receptores potencia el efecto inhibitorio sobre dicha proliferación celular. Este concepto terapéutico es de gran importancia en el tratamiento de tumores malignos, los cuales tienen como propiedad fundamental un
- 25 incremento en la velocidad de proliferación celular.

Se describen combinaciones inmunoterapéuticas que provocan el bloqueo de receptores RTK y/o sus ligandos, mediante la combinación de inmunoterapia activa y/o pasiva contra los mismos.

Los procedimientos referidos pueden ser aplicados a pacientes en diferentes estadios clínicos de tumores de origen epitelial que sobre-expresan el EFG-R.

La combinación de inmunoterapia activa y pasiva puede ser simultánea o secuencial en dependencia de si el procedimiento terapéutico va a ser utilizado en pacientes con enfermedad avanzada o como terapia adyuvante.

En casos de enfermedad avanzada la combinación terapéutica propuesta es la inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, en combinación con la terapia onco-específica de elección, como terapia de ataque; seguido por tratamiento de inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del efecto terapéutico.

En casos de terapia adyuvante las combinaciones terapéuticas propuestas son o el tratamiento de inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor conjuntamente con inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, o la combinación donde el tratamiento de inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, como terapia de ataque; es seguido por el tratamiento simultáneo de inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del efecto terapéutico.

La invención se describe más detalladamente a través de los siguientes procedimientos.

PROCEDIMIENTO 1: Combinación inmunoterapéutica que incluye inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y/o a ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), seguida por inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o
5 **ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes con tumores epiteliales en estadios avanzados.**

Se administra a pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, en los cuales puede ser aplicable alguna otra forma de terapia onco-específica.

Se utiliza primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que
10 reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presenten la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar una terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores. Dicha inmunoterapia pasiva puede administrarse combinada al tratamiento onco-específico de elección.

15 Posteriormente se aplica un tratamiento de inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar un tratamiento de mantenimiento para lograr mayores períodos de estabilización de la enfermedad, así como para evitar aparición de nuevos focos metastásicos.

20 El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango entre 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R y que tengan la propiedad de inhibir dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre cada dosis que oscilará entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses, en combinación con la
25 terapia onco-específica de elección. Se continuará el tratamiento hasta regresión

tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

- Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de inmunización con vacunas dirigidas al EFG-R ó a algún ligando del EGF-R (i.e. EGF, TGF α), unido a una proteína que funcione como transportadora (i.e. la proteína recombinante P64k de *Neisseria Meningitidis*) y administrado en un adyuvante, que pudiera ser alúmina(entre 1 y 2 mg/ dosis), Montanide ISA 51 (entre 0.6 y 1.2 ml por dosis) u otro. Cada dosis contiene entre 50 y 800 ug del principio activo (receptor o ligando) unido a la proteína transportadora, en un volumen final de entre 0.6 y 5 mls. El esquema a utilizar es de entre 5 y 8 inmunizaciones iniciales para inducción de respuesta, con frecuencia que pudiera ser desde semanal hasta quincenal. Las inmunizaciones pueden estar precedidas de dosis de ciclofosfamida que pueden encontrarse entre 100 y 500 mg/m² de masa corporal, suministrados entre 2 y 4 días antes de la 1ra inmunización.
- 15 Las vacunas pueden estar formuladas en algún otro vehículo vacunal (i.e.liposomas, vacunas ADN, vectores virales)

Las vacunas pueden formularse como productos independientes o dentro de una misma formulación vacunal.

- En este período se realizarán extracciones de sangre para medición de parámetros de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el ligando o receptor al que está dirigido la vacuna. Dichas extracciones se realizarán con una frecuencia que puede ser desde semanal a mensual.
- 20

Posteriormente, se realizan reinmunizaciones a la caída de los títulos, con frecuencia que pudiera ser desde mensual a trimestral, por un período de entre 1 y 2 años.

PROCEDIMIENTO 2: Combinación Inmunoterapéutica que incluye Inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e. egf, tgfa), conjuntamente con inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/
5 ligandos del receptor, como tratamiento adyuvante

Se administra al paciente, inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico un tratamiento de inmunoterapia pasiva con AMC que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o a ligandos de dicho receptor (i.e. EGF,
10 TGF α), conjuntamente con un tratamiento activo con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α).

Estos tratamientos, administrados de forma conjunta tendrán un efecto sinérgico, logrando mayores % de regresiones y/o estabilizaciones clínicas de la enfermedad.

15 El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango de 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses. Se continúa el tratamiento hasta
20 regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Conjuntamente se aplican inmunizaciones con vacunas que reconozcan ligandos y/o receptor, con igual esquema que el descrito en el procedimiento #1.

PROCEDIMIENTO 3: Combinación inmunoterapéutica Incluye inmunoterapia
25 pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad

quinasa en residuos de tirosina (i.e. egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e. efg, tgfa), seguida por Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes como terapia adyuvante.

Se administra al paciente inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento
5 quirúrgico.

Se utiliza primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presenten la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α) , con el objetivo de efectuar una
10 terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores.

Posteriormente se aplica un tratamiento de inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar un tratamiento de mantenimiento para lograr mayores intervalos libres de enfermedad, así como para
15 evitar aparición de nuevos focos metastásicos.

El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis de entre 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este
20 tratamiento puede durar entre 1 y 24 meses. Se continuará el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de inmunización con vacunas dirigidas al EFG-R ó a algún ligando del EGF-
25 R (i.e. EGF, TGF α), siguiendo igual esquema que el detallado en el procedimiento #1.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

Ejemplo 1: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando alúmina como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF (US 5,894,018), usando P64 como proteína transportadora y alúmina como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 1.1 (MMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide metastásico de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA , evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:8000, con una cinética como se muestra en la Figura 1.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad hasta el mes 15. El paciente fallece a los 23.2 meses después de iniciada la vacunación

Ejemplo 2: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA51 como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Montanide ISA51 como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 2.1 (AMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF, en un volumen total de entre 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1: 32000, con una cinética como se muestra en la Figura 2.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la enfermedad hasta el mes 12, en el que se diagnosticó una regresión tumoral por
5 criterios tanto clínicos como radiológicos (Figura 3).

En el mes 14 aparece un 2^{do} tumor primario. Fallece de una complicación quirúrgica al mes 18 después de incluido en el ensayo.

**Ejemplo 3: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando Alúmina como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de
10 ciclofosfamida en pacientes con cáncer.**

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

15 El paciente 3.1, FNR, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se trató con una dosis de 100 mg/m² de superficie corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la
20 administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

- 5 Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF, con títulos máximos de hasta 1:8000, como se muestra en la Figura 4.

- Después del inicio de la Vacunación el paciente ha mostrado una estabilización de la
10 enfermedad hasta el mes 19.

Ejemplo 4: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA 51 como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de ciclofosfamida en pacientes con cáncer.

- Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con
15 EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

- El paciente 4.1, JPG, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, células no pequeñas, enfermedad en progresión considerándose no elegible
20 para ningún otro tratamiento onco-específico.

- Se trató con una dosis de 100 mg/kg peso corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF en un volumen total de 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51
25 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA , evaluándose como
5 resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

10 El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:400000, como se muestra en la Figura 5.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la enfermedad hasta el mes 6

**Ejemplo 5: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con
15 estabilización de la enfermedad en pacientes con cáncer.**

En un ensayo Clínico Fase I, 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, fueron tratados con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

20 En el mismo ensayo otros 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, se inmunizaron con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF , en un volumen total de entre 0.6 mls, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O. por encima del doble de la media de los blancos del ensayo).

- 5 En el referido ensayo el 50% de los pacientes desarrollaron una respuesta de anticuerpos con títulos de 1:4000 o mayores (grupo GAR). En el otro 50% de los pacientes los títulos alcanzados fueron menores de 1:4000 (grupo BAR).
- Del grupo GAR, el 87.5% mostraron una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad igual o mayor a 3 meses, después de iniciado el tratamiento.

- 10 Del grupo BAR solo el 11.1% de los pacientes mostraron una estabilización clínica o y radiológica igual o mayor a 3 meses (Tabla 1).

Estos datos demuestran la relación existente entre los niveles de respuesta de anticuerpos anti-EGF y la estabilización tumoral.

Tabla 1: Relación de respuesta de anticuerpos y estabilización clínica y radiológica de la enfermedad.

	% de pacientes	Estabilización de al menos 3 meses, % de pacientes
GAR	50%	87.5%
BAR	50%	11.1%

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con la supervivencia de pacientes con cáncer sometidos a dicho tratamiento.

- Cuarenta pacientes de NSCLC, estadios III y IV, fueron tratados en grupos de 10 con los esquemas detallados en los ejemplos 1,2,3 y 4.

Fueron caracterizados como GAR y BAR según los criterios expuestos en el ejemplo 6.

Del total de pacientes tratados en todos los esquemas, el 50% resulta ser GAR y el 50% BAR.

Al hacer una comparación de las sobrevidas alcanzadas por los pacientes GAR con las alcanzadas por los pacientes BAR, resultó haber una diferencia estadísticamente significativa, con una mediana de sobrevida (SV) para GAR de 9.1 meses, y una mediana de SV para BAR de 4.5 meses ($p < 0.02$). Este resultado puede observarse en la Figura 6.

Ejemplo 7: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

- 10 El paciente RML, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de base de lengua, etapa IV fue incluido en el ensayo clínico de uso combinado del AMC IOR-R3 y radioterapia (RTP). Recibió 6 veces la dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal. La dosis acumulada del AMC fue de 1200 mg y la dosis radiante fue de 60 Gy. Al terminar la terapia combinada el paciente evidenció remisión completa del tumor
- 15 primario y sus metástasis (Figura 7). Esta respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

Ejemplo 8: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

- El paciente EPG, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de amígdala con adenopatías cervicales, etapa III, fue incluido en el ensayo de tratamiento
- 20 combinado del anticuerpo monoclonal humanizado hR3 (depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra) y RTP. Recibió 200 mg del AMC , con frecuencia semanal, durante 6 semanas, y una dosis radiante de 64 Gy.

Al finalizar el tratamiento, este paciente mostró remisión completa de la lesión tumoral (figura 8) y la respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

Ejemplo 9: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente CHA, diagnosticado como portador de tumor de amígdala, en etapa IV, con adenopatías cervicales bilaterales fue incluido en el ensayo de tratamiento combinado del hR3 y RTP. Recibió dosis de 400 mg con frecuencia semanal, durante 6 semanas, para una dosis acumulada de 2400 mg. Concurrentemente recibió una dosis radiante de 64 Gy. Al finalizar el tratamiento este paciente se encontraba en remisión completa del tumor primario y las metástasis loco-regionales (Figura 9). Esta respuesta se mantiene por 12 meses.

Ejemplo 10: Evaluación de combinación de terapia pasiva con anticuerpo anti-EGF-R (IOR-R3) y anticuerpo monoclonal anti-ligando del EGF-R (EGF-1) en ratones atímicos.

Evaluación de efecto anti-tumoral en relación con las dosis administradas. Este experimento simula además el posible efecto de la administración combinada del AMC anti-EGF-R y la Vacuna EGF, ya que esta última provoca una respuesta de anticuerpos anti-EGF que ejerce el mismo efecto que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales con esa especificidad, con la ventaja adicional que la respuesta de anticuerpos lograda por vacunación puede ser mantenida en el tiempo, como se puede observar en los ejemplos 1, 2, 3 y 4, en los que se demuestra la cinética de títulos de anticuerpos en pacientes inmunizados con dicha vacuna.

Siete diferentes grupos de ratones atímicos de fondo genético NMRI (población abierta), fueron inmunizados con :

Grupo 1: 10 dosis de 0.5 mg del AMC EGF-1, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 2: 10 dosis de 1 mg AMC EGF-1, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 3: 10 dosis de 0.5 mg del AMC IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 4: 10 dosis de 1 mg del AMC IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

5 Grupo 5: 10 dosis de PBS, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria (control negativo).

Grupo 6: 10 dosis de la combinación de 0.5m g de EGF-1 y 0.5 mg de IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria

10 Grupo 7: 10 dosis de la combinación de 1m g de EGF-1 y 1 mg de IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria

El mismo día del inicio del tratamiento se les trasplanta 1×10^6 células de la línea tumoral humana H125, que sobre-expresa el EGF-R.

Las Figuras 10 y 11 muestran los resultados obtenidos. Se produce una potenciación del efecto anti-tumoral al combinar ambos tratamientos, y el mismo se hace mayor al
15 aumentar las dosis aplicadas.

Ejemplo 11: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF en paciente con tumor en estadio avanzado:

El paciente ARP, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, recibió un tratamiento combinado secuencial de AMC IOR-R3 y Vacuna EGF.

20 Recibió 6 dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal, durante 6 semanas, conjuntamente con 30 dosis de radioterapia, 5 dosis por semana por 6 semanas, para una dosis radiante acumulada de 60 Gy.

Al finalizar el tratamiento estaba en remisión completa del tumor primario.

Un mes después de finalizado el tratamiento con el AMC, se inició un esquema de
25 inmunización con la Vacuna EGF.

Recibió 5 dosis de 50 ug de EGF conjugado a P64, en un volumen total de 0.6 mls, mezclado hasta emulsificación con 0.6 ml de Montanide ISA 51 en el momento de la inmunización. Las inmunizaciones se realizaron en los días 1,7,14,21 y 51.

El paciente se mantiene en seguimiento.

5 Ejemplo 12: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF como terapia adyuvante:

El paciente MRM, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de pulmón, fue sometido a intervención quirúrgica.

Un mes después del acto quirúrgico, el paciente inició un tratamiento combinado
 10 simultaneando la inmunoterapia pasiva con el AMC IOR-R3 y la vacuna EGF. En la (Figura 12) se detalla el esquema de intervalos de dosificación del tratamiento recibido.

El paciente se encuentra en seguimiento.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS:

Figura 1: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en paciente MMG, inmunizado
 15 según se detalla en el ejemplo 1. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 2: Cinética de respuesta de anticuerpos del paciente AMC, inmunizado según se detalla en el ejemplo 2. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

20 Figura 3: Regresión tumoral observada en el paciente AMC. En la imagen de la izquierda se observa masa tumoral existente al inicio del tratamiento. En la imagen de la derecha se observa que a los 12 meses de iniciado dicho tratamiento la masa tumoral había desaparecido.

Figura 4: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en el paciente FNR, inmunizado según se detalla en el ejemplo 3. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 5: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF del paciente JPG, inmunizado según se detalla en el ejemplo 4. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 6: La figura muestra las curvas Kaplan Meyer de los grupos de pacientes con altas respuestas anti-EGF (GAR) y con bajas respuestas anti-EGF (BAR), así como la de un grupo control histórico.

10 Puede observarse que los GAR presentan un incremento de sobrevida significativo comparados tanto con GAR como con los controles históricos.

Figura 7: Demostración gráfica de remisión del tumor en paciente RML, tratado como se detalla en ejemplo 7.

Figura 8: Demostración gráfica de regresión tumoral en paciente EPG tratado según se
15 detalla en el ejemplo 8.

Figura 9: Demostración gráfica del tumor en paciente CHA, tratado como se detalla en el ejemplo 9.

Figura 10: Grupos de ratones inmunizados con 0.5 mg de cada uno de los AMC IOR-R3 , EGF-1, y con la combinación de 0.5 mg de IOR-R3 + 0.5 mg de EGF1, como se
20 detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.

Figura 11: Grupos de ratones inmunizados con 1mg de cada uno de los AMC IOR-R3 , EGF-1, y con la combinación de 1 mg de IOR-R3 + 1 mg de EGF1, como se detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral
25 en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.

Figura 12: Tratamiento combinado conjunto del AMC IOR-R3 y la Vacuna EGF:

Las flechas por encima del eje de tiempo significan las fechas de administración del AMC (días 1,7,14,21,28 y 35) y las flechas por debajo del eje de tiempo significan los tiempos de las inmunizaciones con la Vacuna EGF (días 2,8,15,22,y 52).

REIVINDICACIONES

1. Una combinación inmunoterapéutica para el tratamiento de tumores, la cual tiene efecto sobre células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK, caracterizada porque dicha combinación comprende la administración de forma simultánea o secuencial de A + B; ó A + C; ó A + D; ó B + C; ó B + D; ó C + D, donde A, B, C y D son:
 - A.- Un anticuerpo contra un receptor RTK;
 - B.- Un anticuerpo contra el(los) ligando(s) del receptor RTK;
 - 10 C.- Una vacuna cuyo principio activo es un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dicho receptor RTK;
 - D.- Una vacuna cuyo principio es el(los) ligando(s) de un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dichos ligando(s) del receptor RTK;
2. Una combinación según la reivindicación 1 donde el anticuerpo monoclonal contra el receptor RTK es un anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF.
3. Una combinación según la reivindicación 2 donde el anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF, es un anticuerpo humanizado.
4. Una combinación según la reivindicación 3 donde el anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF es el hR3, depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra.
5. Una combinación según la reivindicación 1 donde el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK es un anticuerpo contra el EGF.
6. Una combinación según la reivindicación 1 donde el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK es un anticuerpo contra el TGF alfa.

7. Una combinación según las reivindicaciones de la 1 a la 6 donde el principio activo de la vacuna es el receptor del EGF.
8. Una combinación según las reivindicaciones de la 1 a la 6 donde el principio activo de la vacuna es el EGF.
- 5 9. Una combinación según la reivindicación 8 donde el principio activo de la vacuna comprende un conjugado entre la proteína p64K de *Neisseria meningitis* y el EGF.
10. Una combinación según las reivindicaciones de la 1 a la 6 donde el principio activo de la vacuna es el TGF alfa.
11. Una combinación según la reivindicación 10 donde la vacuna comprende como
10 principio activo un conjugado entre la proteína p64K de *Neisseria meningitis* y el TGF alfa.
12. Un método para el control del crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK caracterizado porque comprende el tratamiento con una de las combinaciones terapéuticas definidas en
15 cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11.
13. Un método según reivindicación 12 caracterizado porque las combinaciones pueden ser aplicadas de forma simultánea o secuencial.
14. Un método según reivindicación 13 caracterizado porque cuando se aplican las combinaciones de forma secuencial, la aplicación de los componentes de la
20 combinación se realiza en cualquier orden.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología y más específicamente con la inmunoterapia del cáncer, particularmente con combinaciones
5 inmunoterapéuticas y métodos de tratamiento para impedir el crecimiento de células tumorales y/o eliminar dichas células.

Los métodos descritos en la presente invención se basan en el bloqueo de receptores con actividad de proteínas quinasas en residuos de tirosina (RTK) y de ligandos para dichos receptores.

10 Se describen combinaciones inmunoterapéuticas que provocan el bloqueo de receptores RTK y/o sus ligandos, mediante la combinación de inmunoterapia activa y/o pasiva contra los mismos y los procedimientos referidos pueden ser aplicados a pacientes en diferentes estadios clínicos de tumores de origen epitelial que sobre-
expresan estos receptores. La combinación de inmunoterapia activa y pasiva puede ser
15 simultánea o secuencial en dependencia de si el procedimiento terapéutico va a ser utilizado en pacientes con enfermedad avanzada o como terapia adyuvante.

Figura 1:

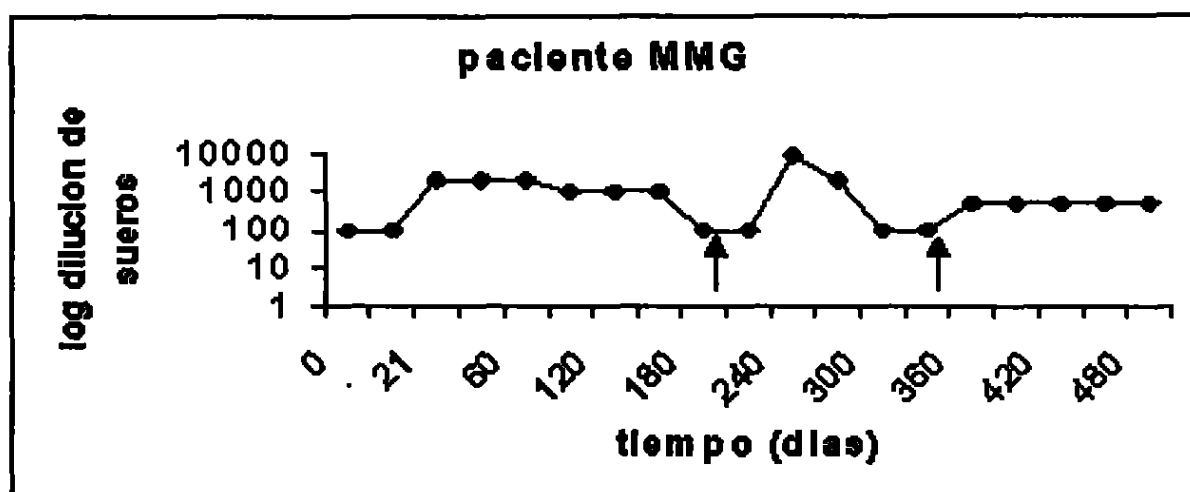
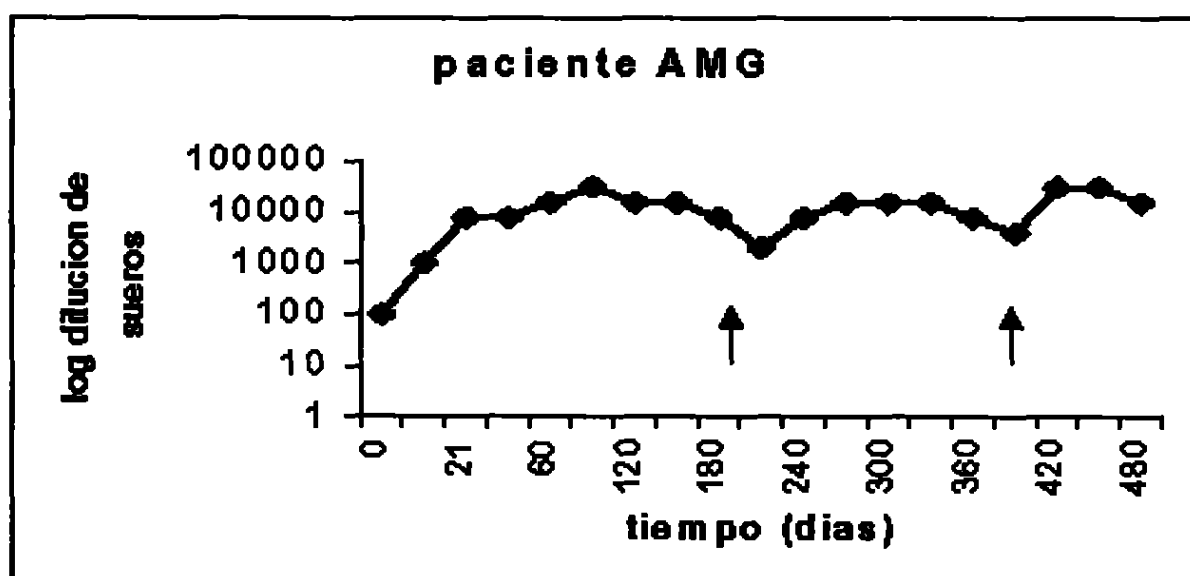


Figura 2:



2/7

Figura 3:



Figura 4:

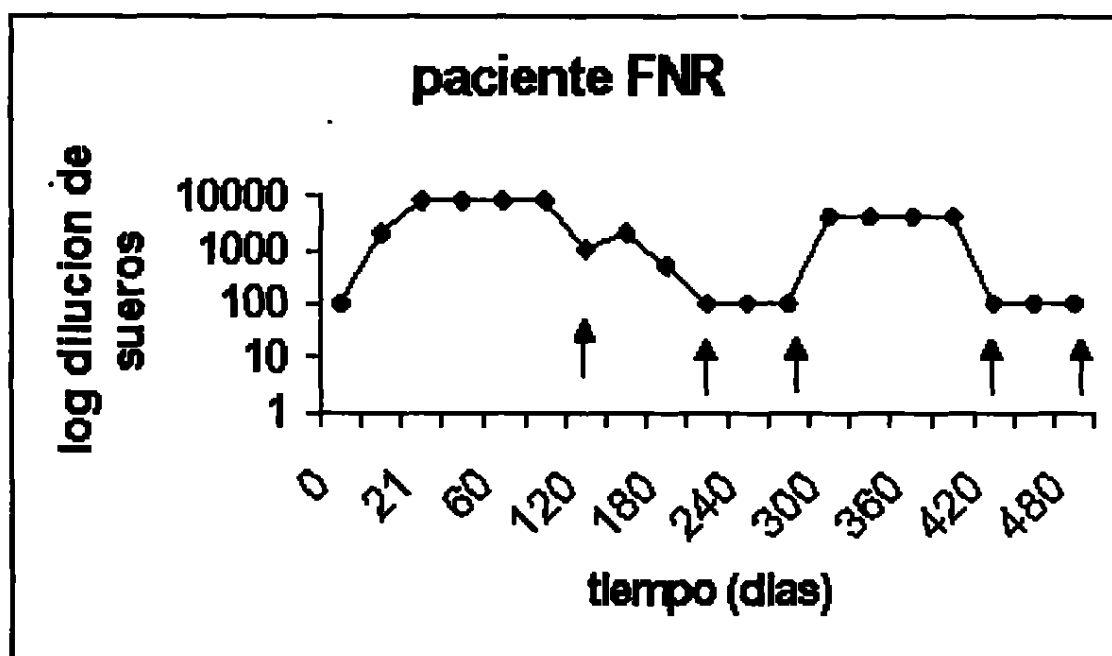


Figura 5:

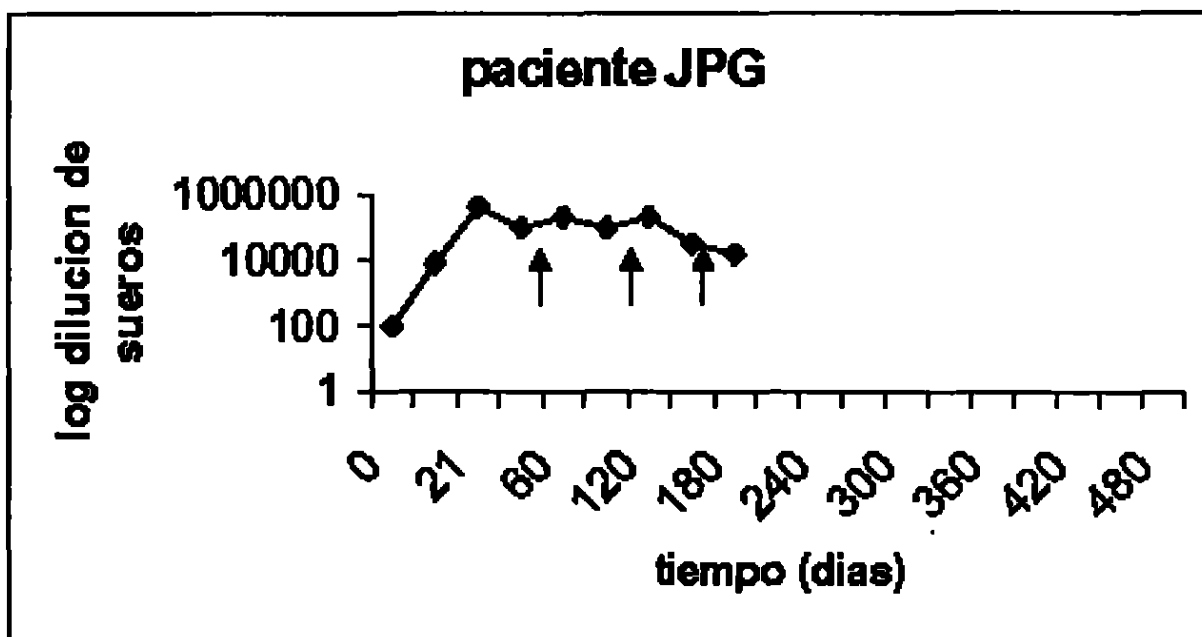
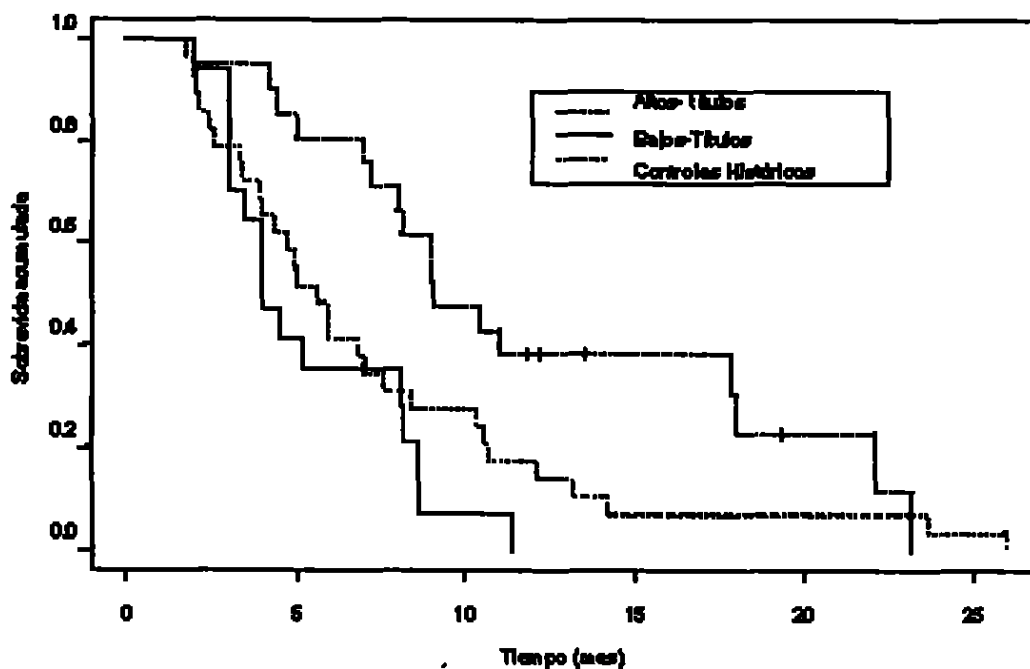


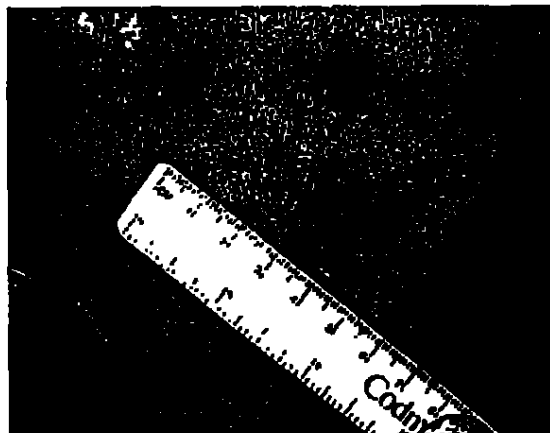
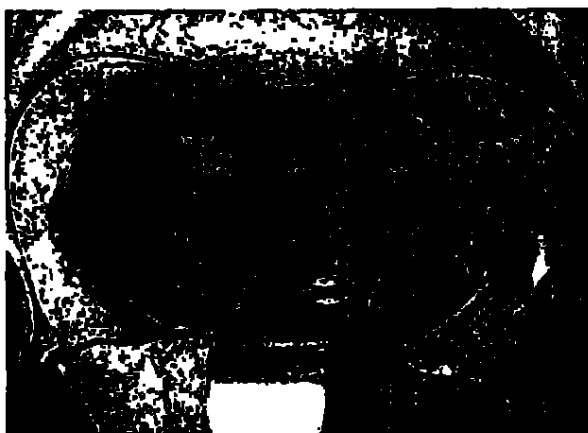
Figura 6:



4/7

Figura 7:**Tumor (Base Base de la lengua)****Antes****Remisión completa****Después****Figura 8:****Tumor (amígdala)****Remisión completa**

Figura 9:



Antes (tumor de amígdala y nódulo cervical)



Después (Remisión completa del tumor primario y del nódulo cervical)

6/7

Figura 10:

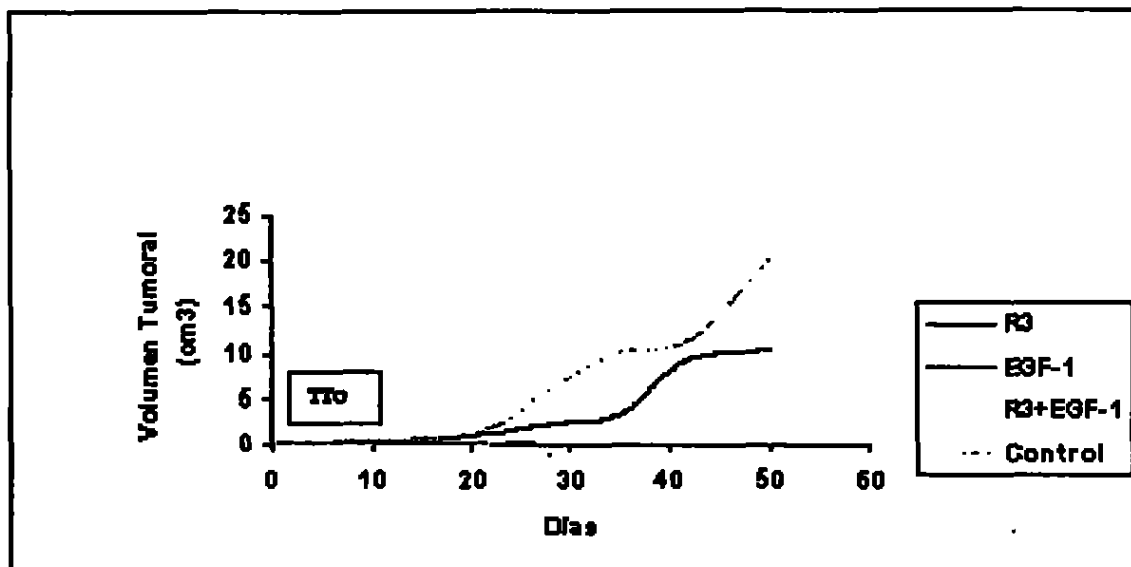


Figura 11:

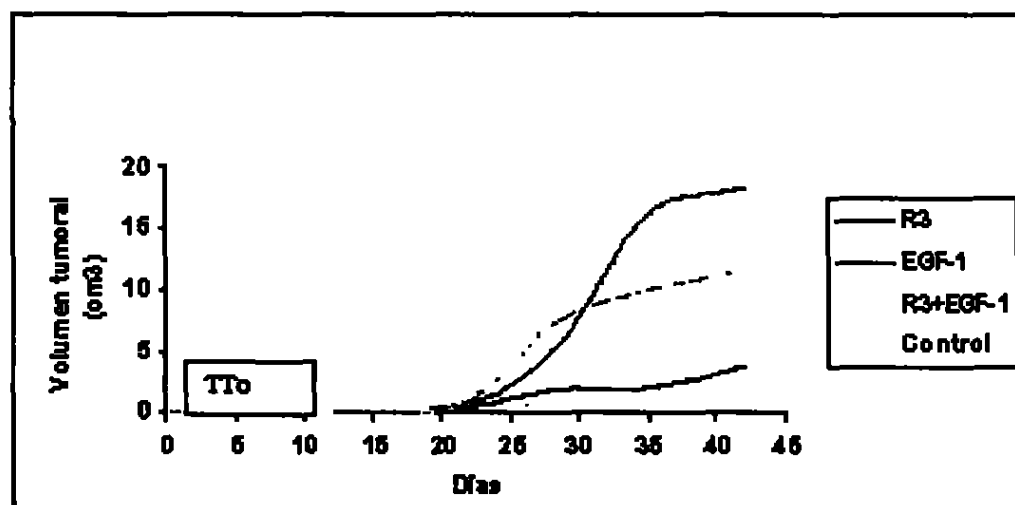
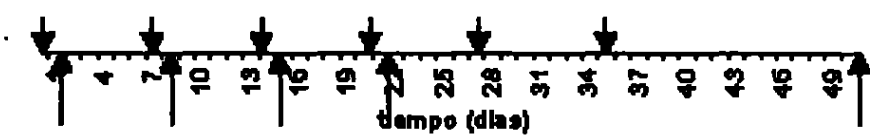


Figura 12:



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT/CU01/00012	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/418)	
International application No. PCT/CU01/00012	International filing date (day/month/year) 08/12/2001	Priority date (day/month/year) 08/12/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/395		
Applicant CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR et al.		
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 38. 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.18 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 13 sheets.		
3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the report - II ☐ Priority - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability - IV ☐ Lack of unity of invention - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement - VI ☐ Certain documents cited - VII ☐ Certain defects in the international application - VIII ☐ Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 02/07/2002	Date of completion of this report 21.03.2003	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 epru d Fax: +49 89 2369 - 4445	Authorized officer Herrero, M. 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/CU01/0001

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17):*

Description, pages:

1-12 as received on 11/03/2003 with letter of 06/03/2003

Claims, No.:

1-11 as received on 11/03/2003 with letter of 06/03/2003

Drawings, sheets:

1/8-8/8 as received on 03/01/2002 with letter of 03/01/2002

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: english , which is:

- ☒ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☒ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/CU01/00012

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:
see separate sheet

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims 1-11
	No:	Claims
Inventive step (IS)	Yes:	Claims
	No:	Claims 1-11
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims 1-11
	No:	Claims

- 2. Citations and explanations**
see separate sheet

SECTION I

6. Additional observations:

- 6.1** The amendments filed with the letter dated 06.03.03 do not appear to contravene Article 34(2)(b) PCT.
- 6.2** This preliminary examination report takes into account the content of the Applicants' letter of 06.03.03 in reply to the written opinion dated 07.02.03, as well as the additional technical information provided therein.
- 6.3** Taking into account the amendments carried out in the description, the drawing sheets 1/8-8/8 filed with letter of 03.01.02 should have also been amended and renumbered. Thus it seems that present Figures 10 and 11 (on drawing sheet 7/8) should have been deleted and present Figure 12 should have been renumbered as Figure 10.
- 6.4** The following inconsistency between the newly filed translated version of the description and the corresponding Spanish version as originally filed has been noticed:

While present page 5, lines 3-5 reads "... an adequate adjuvant i.e alum (between 1 and 2 mg/dose) or Montanide ISA 51(between 0.6 and 1.2 ml/dose)" a direct translation of the Spanish version should have referred to an adjuvant "which could be alum (between 1 and 2 mg/dose), Montanide ISA 51(between 0.6 and 1.2 ml/dose) or another one".

SECTION V

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

- 2.1** The following document has been considered for the purposes of this report:

D1: EP-A-0586002 (cited in the application)

Document D1 discloses a monoclonal antibody (MoAb) directed against the epidermal growth factor receptor (EGF-R), which MoAb possesses certain properties that render it useful for passive immunotherapy within the treatment of malignant neoplasms or pre-neoplastic diseases. Therapeutic compositions suitable for passive immunotherapy (e.g. for the treatment or prevention of malignant neoplasms or pre-neoplastic diseases, especially in central nervous system tumors of the head and neck, and breast and lung adenocarcinomas) comprising such an anti-EGF-R MoAb together with a MoAb directed against EGF are described and claimed in D1 (cf page 8, lines 31-44 and Claim 18).

- 2.2 The present disclosure describes that an immunotherapeutic combination for the treatment of cancer in patients with tumors of epithelial origin that over-express EGF-R, in different clinical stages, which includes passive immunotherapy with MoAbs directed against EGF-R and/or its ligands (e.g. EGF, TGF alpha) followed by active immunotherapy with vaccines directed against the EGF-R and/or its ligands (according to the procedures 1, 2 and 3 described on pages 4-7), leads to improved results in terms of disease stabilization or regression.

The desirable effect obtainable by using the aforementioned immunotherapeutic combination appears to be neither disclosed nor rendered obvious by the available prior art.

The additional experimental information provided by the applicants with their letter dated 06.03.03 substantiates that, by means of employing the therapeutical approaches presently described in Examples 10 and 11 the expected results which represent the technical solution to the problem posed are indeed achieved, i.e. survival in the case of both head and neck cancer patients (cf Example 10) and lung cancer patients (cf Example 11).

In line with the foregoing the presence of an inventive step associated with the claimed solution according to present Claims 1-11, i.e. immunotherapeutic kits for the treatment of tumors, can in principle be acknowledged insofar as the relevant components of the kit A, B, C and D as defined in Claim 1 relate to the receptor with tyrosine kinase activity EGF-R and its ligands (e.g. EGF and TGF alpha).

Notwithstanding the above, the available experimental evidence is not sufficient to ascertain that corresponding survival results providing an effective solution to the problem posed could be similarly achieved employing therapeutic approaches equivalent to those of Examples 10 and 11, but having as target any possible receptor with tyrosine kinase activity (RTK) different from EGF-R. Thus, under its present wording independent Claim 1 and dependent Claims 2-11 cannot be acknowledged as inventive over their whole scope, contrary to Art. 33(3) PCT.

2.3 Further comments

The subject-matter presently claimed which does not rely on the combination of passive immunotherapy with MoAbs directed against EGF-R and/or its ligands (e.g. EGF, TGF alpha) and active immunotherapy with vaccines directed against the EGF-R and/or its ligands, for the purpose of treating cancer in patients with tumors of epithelial origin that over-express EGF-R, is considered to lack support in the description within the meaning of Art. 6 PCT and is not sufficiently disclosed in the application as originally filed, contrary to the requirements of Art. 5 PCT.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(Artículo 38 y Regla 70 del PCT)

Archivo de referencia del solicitante o del agente PCT/CU01/00012	PARA ACCION POSTERIOR	Ver Notificación de Transmisión del Informe del Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/1PEA/416)
Solicitud internacional No. PCT/CU01/00012	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) Diciembre 8, 2001 (08/12/2001)	Fecha de prioridad (día/mes/año) Diciembre 8, 2000 (08/12/2000)
Clasificación Internacional de Patente (CIP) o Clasificación Nacional y CIP A61K39/395		
Solicitante: CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, et al.		
1 Este Informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo con el Artículo 38. 2 Este INFORME consiste en un total de <u>8</u> hojas, incluyendo esta carátula. ☒ Este informe también se acompaña de los ANEXOS, esto es, hojas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido reformados y son la base de este Informe y/o hojas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas según el PCT) Estos anexos consisten en un total de <u>13</u> hojas.		
3 Este Informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Base del informe II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, altura inventiva y aplicación industrial IV ☐ Carencia de unidad de la invención V ☒ Declaración razonada según artículo 35(2) con relación a la novedad, altura inventiva o aplicación industrial; citas y explicaciones que apoyan tal declaración VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		

Fecha de presentación de la demanda 2 de Julio de 2002 (02/07/2002)	Fecha de completamiento de este informe 21 de Marzo de 2003 (21/03/2003)
Nombre y dirección de correo del IPEA/JP European Patent Office D-80298 Munich Tel.: +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax.: +49 89 2399 - 4465	Funcionario autorizado Herrero, M Teléfono No. 49 89 2399 7332

INF RME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/CU01/00012

I. Base del Informe

- 1 Con relación a los elementos de la solicitud Internacional (las páginas reemplazadas que han sido presentadas a la oficina receptora en respuesta a la invitación con respecto al Art. 14 están referidas en este Informe "originalmente presentadas" y no se anexan a este Informe ya que estas no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, páginas:

1 - 12 como se recibieron en 11/3/03 con carta de 6/3/03

Reivindicaciones Nos.:

1 - 11 como se recibieron en 11/3/03 con carta de 6/3/03

Dibujos, páginas:

1/8 - 8/8 como se recibieron en 3/1/02 con carta de 3/1/02

- 2 Con relación al idioma, todos los elementos antes marcados se pusieron a disposición y se suministraron a esta autoridad en el idioma en el que se presentó la solicitud Internacional, a menos que se indique de otra forma en este punto.

Estos elementos se pusieron a disposición o se suministraron a esta autoridad en el siguiente idioma Inglés, el cual es:

- ☒ el idioma de una traducción suministrada para fines de Investigación Internacional (según la Regla 23.1(b)).
☐ el idioma de publicación de la solicitud Internacional (bajo la Regla 48.3(b)).
☒ el idioma de la traducción suministrada para fines de examen preliminar Internacional (bajo la Regla 55.2 y/o 55.3)

- 3 Con relación a cualquier nucleótido y/o secuencia amino ácida descubierta en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo con base en la lista de secuencia:

- ☐ contenida en la solicitud internacional en forma escrita
☐ presentado junto con la solicitud Internacional en forma legible en computador
☐ suministrado con posterioridad a esta autoridad en forma escrita
☐ suministrado luego a esta autoridad en forma legible en computador
☐ la declaración que el listado de secuencia escrito suministrado posteriormente no va más allá del descubrimiento en la solicitud internacional que se presentó ha sido suministrada
☐ la declaración que la información grabada en forma legible en computador es idéntica a la lista de secuencia escrita ha sido suministrada

- 4 Las reformas han dado como resultado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/fig.

- 5 Este informe ha sido establecido como si (parte de) las reformas no han sido hechas, ya que se consideran que han ido más allá del descubrimiento que fue presentado, como se indica en la casilla suplementaria (Regla 70.2 (c)).

- 6 Observaciones adicionales, si es necesario:
Ver hoja separada

**V. Declaración razonada bajo el artículo 35(2) con relación a la novedad, altura inventiva o aplicación industrial:
citas y explicaciones que apoyan tal declaración.**

1 Declaración				
Novedad (N)	Reivindicaciones	1-11	Si	
	Reivindicaciones		No	
Altura Inventiva (IS)	Reivindicaciones	1-11	SI	
	Reivindicaciones		No	
Aplicación Industrial (IA)	Reivindicaciones	1-11	SI	
	Reivindicaciones		No	
2 Citas y explicaciones				
Ver hoja separada				

**INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
PAGINA ANEXA**

Solicitud Internacional No.
PCT/CU01/00012

Sección I:

6 Observaciones adicionales:

6.1 Las modificaciones presentadas con la carta de fecha 06.03.03 no parecen infringir el artículo 34 (2) (b) PCT.

6.2 Se tiene en cuenta en este Informe de examen preliminar el contenido de la carta del solicitante de 06-03-03 en respuesta a la opinión escrita de fecha 07.02.03, también como la información técnica adicional suministrada en ella.

6.3 Teniendo en cuenta las correcciones llevadas a cabo en la descripción, las hojas de los dibujos 1/8-8/8 presentadas con la carta del 03.01.02 deberían también ser corregidas y enumeradas. Parece entonces que las presentes figuras 10 y 11 (en la página de dibujo 7/8 debería cancelarse y la presente Figura 12 debería volverse a enumerar como la Figura 10.

6.4 La siguiente inconsistencia se ha notado entre la nueva versión traducida presentada de la descripción y la correspondiente versión en Español que originalmente fue presentada:

mientras que la presente página 5, líneas 3-5 se lee "... Un coadyuvante adecuado e.j alumbre (entre 1 y 2 mg/dosis) o Montanide ISA 51 (entre 0.6 y 1.2 ml/dosis)" una traducción directa de la versión de Español debería referirse a un coadyuvante, "el cual puede ser alumbre (entre 1 y 2 mg/dosis), Montanide ISA 51 (entre 0.6 y 1.2 ml/dosis) u otra.

Sección V:

2 CITACIONES Y EXPLICACIONES

2.1 Se ha considerado el siguiente documento para el propósito de este Informe:

D.1: EP-A-0580002 (citado en la solicitud)

El documento D1 revela un anticuerpo monoclonal (MoAb) dirigido en contra de receptor del factor de crecimiento (EGF-R), cuyo MoAb posee ciertas propiedades que proporcionan una utilidad para la Inmunoterapia pasiva dentro del tratamiento de neoplasmas malignos o enfermedades pre-neoplásico. Composiciones terapéuticas disponibles para la Inmunoterapia pasiva (e.j para el tratamiento o la prevención de neoplasmas malignos o enfermedades pre-neoplásico, especialmente en los tumores del sistema nervioso central de la cabeza y el cuello, y el pecho y adenocarcinomas del pulmón) comprendiendo un anti-EGF-R MoAb junto con un MoAb dirigido en contra del EGF se describen en lo reclamado por D1 (página 8, líneas 31-44 y reivindicación 18).

2.2 La presente revelación describe que una combinación Inmunoterapéutica para el tratamiento de cáncer en pacientes con tumores de origen epitelial que sobreexpresan EGF-R, en diferentes etapas clínicas, que incluye inmunoterapia pasiva con MoAbs dirigido en contra de EGF-R y/o sus ligantes (e.j. EGF, TGF alfa) seguido por una Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas en contra de EGF-R y/o sus ligantes (de acuerdo a sus procedimientos 1,2 y 3 descritos en las páginas 4.7), conlleva a resultados mejorados en términos de la regresión o estabilización de la enfermedad.

El efecto deseable obtenido mediante el uso de la mencionada combinación Inmunoterapia parece no haberse revelado ni haberse proporcionado de manera obvia por el arte previo disponible.

La información experimental adicional proporcionada por los solicitantes con la carta de fecha 08.03.03 comprueba que, mediante el empleo de los alcances terapéuticos descritos en los ejemplos 10 y 11 los resultados esperados que representan la solución técnica al problema expuesto son claramente alcanzados, e.j. supervivencia en el caso de ambos pacientes con cáncer en la cabeza y el cuello (ejemplo 10), y pacientes con cáncer en los pulmones (ejemplo 11).

En continuación con lo anterior se reconoce la presencia de un nivel inventivo asociado con la solución reivindicada de acuerdo con las reivindicaciones 1-11, le juego de inmunoterapéuticos para el tratamiento de tumores como los revelantes componentes del juego A,B,C y D definido en la reivindicación 1 relacionado al receptor con la actividad tirosina quinada EGF-R y sus ligantes (e.j EGF y TGF alfa).

No obstante a lo anterior, la evidencia experimental disponible no es suficiente para averiguar que los resultados de supervivencia correspondientes proporcionan una solución efectiva al problema expuesto podría ser similarmente logrado empleando alcances terapéuticos equivalentes a los de los ejemplos 10 y 11, pero teniendo como objetivo algún posible receptor con tirosine quinasa activo (RTK) diferente de EGF-R. Por lo tanto, en relación a la presente redacción de la reivindicación Independiente 1 las reivindicaciones dependientes 2 a 11 no pueden ser reconocidas como inventivas en relación a todo el alcance, contrario al artículo 33 (3) del PCT.

2.3 Comentarios adicionales

La materia objeto actualmente reclamada la cual no depende de la combinación de la inmunoterapia pasiva con MoAb dirigida en contra del EGF-R y/o sus ligandos (e.j EGF, TGF alfa) y la Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas en contra al EGF-R y/o sus ligandos, para el propósito de tratar el cáncer en pacientes con tumores de origen epitelial que se sobre expresan EGF-R, se considera que carecen de soporte en la descripción dentro del significado del artículo 6 PCT y no está suficientemente revelado en la solicitud originalmente presentada, contrario a los requerimientos del artículo 5 del PCT.



CAMR
Today's Research
Tomorrow's Health

Microbiological Research Authority

Centre for Applied Microbiology and Research

This document certifies that Cell Culture
(Deposit ref 951110101) has been accepted
as a patent deposit, in accordance with
The Budapest Treaty of 1977,
with the European Collection of Animal Cell Cultures on
10th November 1995


Dr. Alan Doyle,
Head, Animal Cell Resources.

**MODIFICACION DE LAS REIVINDICACIONES
DE CONFORMIDAD CON EL ARTICULO
39(1) DEL PCT**

JUEGO DE REACTIVOS INMUNOTERAPEUTICO PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES

Sector Técnico

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología y más específicamente con la inmunoterapia del cáncer, particularmente con combinaciones inmunoterapéuticas y métodos de tratamiento para impedir el crecimiento de células tumorales y/o eliminar dichas células.

Técnica Anterior

El sistema del receptor de EGF (EGF-R) y sus ligandos constituye un complejo molecular cuya interacción regula de forma específica el crecimiento celular y ha sido demostrado su impacto en el crecimiento descontrolado de tumores de origen epitelial. En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracrinos y autocrinos de activación del EGF-R, esta dada tanto por la sobreproducción de los factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

El receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF-R, siglas en Inglés) es una glicoproteína transmembrana de 1186 aminoácidos y 170 kD de peso molecular que se encuentra ampliamente expresada en los tejidos del organismo, y ha sido implicada en varias etapas del desarrollo embriogénico. La unión de sus ligandos específicos, EGF o TGF- α , induce la dimerización del receptor así como también la heterodimerización con otros miembros de la familia ErbB, entre ellos el HER-2 (Cohen BD *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271:7620-7629). La unión de los ligandos al receptor dispara una cascada de señales intracelulares (Ullrich A and Schlessinger J (1990) *Cell* 61:203-212) que conducen al crecimiento y diferenciación de las células. La sobreexpresión de este receptor en algunos tipos de neoplasias, fundamentalmente de origen epitelial, ha sido blanco de atención en la inmunoterapia del cáncer. Tal es el caso de tumores de mama, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, próstata y tumores de cabeza y cuello. La presencia de EGF-R ha probado ser una indicación de mal pronóstico en cáncer de mama (Pérez R *et al.* (1984) *Breast Cancer and Treatment* 4:189-193). Aún cuando no se conoce todavía el papel que juega el sistema del EGF-R y sus ligandos en la regulación del crecimiento tumoral, se ha sugerido que la expresión del EGF-R en células tumorales proporciona un mecanismo para la estimulación autocrina que conduce a

la proliferación descontrolada de dichas células (Schlessinger J et al. (1983) *Crit Rev Biochem* 14 (2):93-111).

Los principales ligandos de este sistema son el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor de Crecimiento Transformante de tipo alfa (TGF α). Además,

5 existen otros ligandos que pertenecen a la superfamilia del EGF, como son: anfregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, epregulina, entre otros. El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos con un peso molecular de 6045 Da, el cual resulta mitogénico para células de origen epitelial, ejerciendo su acción fundamentalmente paracrina a partir de su unión al
10 EGF-R. El TGF α es un polipéptido de 50 aminoácidos, capaz de competir con el EGF por la unión al EGF-R. Anticuerpos anti-EGF no son capaces de reconocer al TGF α (Todaro G J et al. (1976), *Nature* 264:26-31), por lo que ambos factores de crecimiento son dos entidades inmunológicamente diferentes.

El sistema del EGF-R y sus ligandos ha sido utilizado como blanco de inmunoterapia
15 pasiva (IP), mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (AMC) contra el EGF-R, en forma nativa, asociados a drogas, toxinas, o isótopos radiactivos (Vollmar AM et al. (1987) *J Cell Physiol* 131:418-425) en la IP de tumores con alta expresión de este receptor. Estos anticuerpos han sido seleccionados por su capacidad de inhibir la unión del EGF a su receptor (anticuerpos neutralizantes). Varios ensayos
20 clínicos con AMC se están llevando a cabo y algunos han mostrado resultados promisorios como es el caso del ensayo clínico con el AMC C225 en cáncer de mama, de células pancreáticas y de células renales en fase II y cabeza-cuello en fase III (Mendelsohn J et al. (1999) American Society of Clinical Oncology Meeting). Otro ensayo clínico de Fase II con buenos resultados es el ensayo efectuado con el
25 AMC IOR-R3 en tumores de pulmón (Crombet T et al. (2000) *Cancer Biotherapy and Biopharmaceutical*, manuscrito aceptado).

La inmunoterapia pasiva con el Anticuerpo Monoclonal IOR-R3 específico contra el EGF-R, referido en la patente europea EP 586002B1, ha demostrado que la unión
30 específica del IOR-R3 al receptor inhibe la unión del EGF al mismo, e inhibe la autofosforilación del Receptor, dependiente de EGF. A su vez, la inmunoterapia pasiva con IOR-R3 inhibió el crecimiento de células tumorales humanas en ratones desnudos, y ha disminuido la velocidad de crecimiento del tumor de algunos pacientes en ensayo clínico.

Este sistema también ha sido blanco de inmunoterapia activa específica de cáncer. Un ejemplo de ello lo constituye el uso de una vacuna que contiene uno de los principales ligandos del EGF-R, el EGF, acoplado a una proteína transportadora (US 5,894,018). Esta vacuna es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos específica contra el EGF autólogo e inhibir la unión del mismo a su receptor, bloqueando los mecanismos de proliferación desencadenados por esta unión. Estudios preclínicos han mostrado que la inmunización de ratones con EGF autólogo acoplado a una proteína transportadora en adyuvante incrementa la supervivencia de ratones transplantados con el tumor ascítico de Ehrlich (TAE) (González G et al (1996), *Vaccine Research* 5(4):233-243; González G et al (1997) *Vaccine Research* 6(2):91-100).

Con una vacuna conteniendo EGF humano recombinante se han reportado los resultados de un ensayo clínico Fase I, que demuestran la inmunogenicidad y la no-toxicidad provocada por la vacunación. (González G et al (1998), *Annals of Oncology* 9:1-5).

Divulgación de la invención.

En la presente invención se propone la utilización de inmunoterapias combinadas, dirigidas tanto contra el receptor con actividad quinasas en residuos de tirosina (RTK) como contra sus ligandos, con el objetivo de potenciar el efecto observado al aplicar de manera independiente las diferentes formas de inmunoterapia descritas en el estado del arte, dirigidas solo contra alguno de los componentes del sistema receptor/ligando. Esta potenciación se justifica por el bloqueo conjunto de ambos, ligandos y receptor, en un método de tratamiento que incluya ambos principios activos.

Más particularmente la invención se refiere a un juego de reactivos inmunoterapéuticos para el tratamiento de tumores con efecto sobre células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK, el cual comprende la administración de forma simultánea o secuencial de A + C; ó A + D; ó B + C; ó B + D; donde A, B, C y D son:

- A.- Un anticuerpo contra un receptor RTK;
- B.- Un anticuerpo contra el(los) ligando(s) del receptor RTK;
- C.- Una vacuna cuyo principio activo es un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dicho receptor RTK;

D.- Una vacuna cuyo principio es el(los) ligando(s) de un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dichos ligando(s) del receptor RTK;

En una realización particular de la invención, el anticuerpo monoclonal contra el receptor RTK es un anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF, y más específicamente es el anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF, el hR3, depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra.

En otra materialización de la invención el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK seleccionado puede ser un anticuerpo contra el EGF o contra el TGF alfa.

10 Asimismo la invención refiere un juego de reactivos inmunoterapéutico donde el principio activo de la vacuna puede ser el receptor del EGF, el propio EGF o el TGF alfa, o un conjugado de estos principios activos con la proteína p64K de *Neisseria meningitidis*.

Igualmente la invención se refiere a un método para el control del crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK el cual comprende el tratamiento con las combinaciones terapéuticas de la invención, las cuales pueden ser aplicadas de forma simultánea o secuencial, en cuyo caso dicha aplicación de los componentes de la combinación se realiza en cualquier orden.

20 El juego de reactivos inmunoterapéutico de la invención en las combinaciones propuestas impide el crecimiento de células tumorales ó eliminan dichas células, mediante el bloqueo de receptores RTK y de sus ligandos. Este bloqueo puede lograrse, entre otras aproximaciones, con la combinación, tanto simultánea como secuencial de inmunoterapias activas (vacunas terapéuticas) y/o pasivas (Anticuerpos Monoclonales) dirigidas a factores de crecimiento tales como el Factor de Crecimiento Epidérmico, EGF siglas en Inglés, y el Factor de Crecimiento Transformante de tipo alfa, TGF α y sus receptores (i.e. EGF-R).

El bloqueo de los factores de crecimiento o de sus receptores provoca un efecto de detención de la proliferación celular. En esta invención se muestra como el bloqueo simultáneo tanto de ligandos como de receptores potencia el efecto inhibitorio sobre dicha proliferación celular. Este concepto terapéutico es de gran importancia en el tratamiento de tumores malignos, los cuales tienen como propiedad fundamental un incremento en la velocidad de proliferación celular.

Se describen combinaciones inmunoterapéuticas de los reactivos que conforman dicho juego, las cuales provocan el bloqueo de receptores RTK y/o sus ligandos, mediante la combinación de inmunoterapia activa y pasiva contra los mismos.

Los procedimientos referidos pueden ser aplicados a pacientes en diferentes
5 estadios clínicos de tumores de origen epitelial que sobre-expresan el EFG-R.

La combinación de inmunoterapia activa y pasiva puede ser simultánea o secuencial en dependencia de si el procedimiento terapéutico va a ser utilizado en pacientes con enfermedad avanzada o como terapia adyuvante.

En casos de enfermedad avanzada la combinación terapéutica propuesta es la
10 inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, en combinación con la terapia onco-específica de elección, como terapia de ataque; seguido por tratamiento de inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del
15 efecto terapéutico.

En casos de terapia adyuvante las combinaciones terapéuticas propuestas son o el tratamiento de inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor conjuntamente con inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho
20 receptor y/o al propio receptor, o la combinación donde el tratamiento de inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, como terapia de ataque; es seguido por el tratamiento simultáneo de inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho
25 receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del efecto terapéutico.

El modo de emplear el juego de reactivos de la invención se describe más detalladamente a través de los siguientes procedimientos.

PROCEDIMIENTO 1: Combinación Inmunoterapéutica que Incluye
30 **Inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y/o a ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), seguida por Inmunoterapia activa con**

vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes con tumores epiteliales en estadios avanzados.

Se administra a pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, en los cuales puede ser aplicable alguna otra forma de terapia onco-específica.

- 5 Se utiliza primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan a un receptor con actividad quínasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presenten la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar una terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores.**
- 10 Dicha Inmunoterapia pasiva puede administrarse combinada al tratamiento onco-específico de elección.**
Posteriormente se aplica un tratamiento de inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar un tratamiento
- 15 de mantenimiento para lograr mayores períodos de estabilización de la enfermedad, así como para evitar aparición de nuevos focos metastásicos.**
El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango entre 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R y que tengan la propiedad de inhibir dicho receptor, y/o
- 20 de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre cada dosis que oscilará entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses, en combinación con la terapia onco-específica de elección. Se continuará el tratamiento, hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.**
- 25 Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de inmunización con vacunas dirigidas al EGF-R ó a algún ligando del EGF-R (i.e. EGF, TGF α), unido a una proteína que funcione como transportadora (i.e. la proteína recombinante P64k de *Neisseria Meningitidis*) y administrado en un adyuvante, que pudiera ser alúmina (entre 1 y 2 mg/ dosis), Montanide ISA 51 (entre**
- 30 0.6 y 1.2 ml por dosis) u otro. Cada dosis contiene entre 50 y 800 ug del principio activo (receptor o ligando) unido a la proteína transportadora, en un volumen final de entre 0.6 y 5 mls. El esquema de inmunización a utilizar es de entre 5 y 8 inmunizaciones iniciales para inducción de respuesta, con frecuencia que pudiera**

ser desde semanal hasta quincenal. Las inmunizaciones pueden estar precedidas de dosis de ciclofosfamida que pueden encontrarse entre 100 y 500 mg/m² de masa corporal, suministrados entre 2 y 4 días antes de la 1ra inmunización.

Las vacunas pueden estar formuladas en algún otro vehículo vacunal (i.e. liposomas, vacunas ADN, vectores virales)

Las vacunas pueden formularse como productos independientes o dentro de una misma formulación vacunal.

En este período se realizarán extracciones de sangre para medición de parámetros de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el ligando o receptor al que está dirigido la vacuna. Dichas extracciones se realizarán con una frecuencia que puede ser desde semanal a mensual.

Posteriormente, se realizan reinmunizaciones a la caída de los títulos, con frecuencia que pudiera ser desde mensual a trimestral, por un período de entre 1 y 2 años.

PROCEDIMIENTO 2: Combinación Inmunoterapéutica que incluye Inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e. egf, tgfa), conjuntamente con inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, como tratamiento adyuvante

Se administra al paciente, inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico un tratamiento de inmunoterapia pasiva con AMC que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o a ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGFa), conjuntamente con un tratamiento activo con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGFa).

Estos tratamientos, administrados de forma conjunta tendrán un efecto sinérgico, logrando mayores % de regresiones y/o estabilizaciones clínicas de la enfermedad.

El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango de 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses. Se

continúa el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Conjuntamente se aplican inmunizaciones con vacunas que reconozcan ligandos y/o receptor, con igual esquema que el descrito en el procedimiento #1.

- 5 **PROCEDIMIENTO 3: Combinación Inmunoterapéutica Incluye Inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e.egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e.egf, tgfa), seguida por Inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes como terapia**
10 **adyuvante.**

Se administra al paciente inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico.

- Se utiliza primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina
15 (i.e.EGF-R) y que presenten la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e.EGF, TGFa) , con el objetivo de efectuar una terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores.

- Posteriormente se aplica un tratamiento de Inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e.EGF-R) y/o
20 de ligandos del receptor (i.e.EGF, TGFa), con el objetivo de efectuar un tratamiento de mantenimiento para lograr mayores intervalos libres de enfermedad, así como para evitar aparición de nuevos focos metastásicos.

- El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis de entre 100 y 400 mg de AMC que
25 reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar entre 1 y 24 meses. Se continuará el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

- 30 Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de Inmunización con vacunas dirigidas al EFG-R ó a algún ligando del EGF-R (i.e. EGF, TGFa), siguiendo igual esquema que el detallado en el procedimiento #1.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN:

Ejemplo 1: Esquema de Inmunización con Vacuna EGF utilizando alúmina como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF (US 5,894,018), usando P64 como proteína transportadora y alúmina como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 1.1 (MMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide metastásico de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:8000, con una cinética como se muestra en la Figura 1.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad hasta el mes 15. El paciente fallece a los 23.2 meses después de iniciada la vacunación

Ejemplo 2: Esquema de Inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA51 como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Montanide ISA51 como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 2.1 (AMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF, en un volumen total de entre 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1: 32000, con una cinética como se muestra en la Figura 2.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la enfermedad hasta el mes 12, en el que se diagnosticó una regresión tumoral por criterios tanto clínicos como radiológicos (Figura 3).

En el mes 14 aparece un 2^{do} tumor primario. Fallece de una complicación quirúrgica al mes 18 después de incluido en el ensayo.

Ejemplo 3: Esquema de Inmunización con Vacuna EGF utilizando Alúmina como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de ciclofosfamida en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 3.1, FNR, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se trató con una dosis de 100 mg/m² de superficie corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

- 5 Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

- 15 El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF, con títulos máximos de hasta 1:8000, como se muestra en la Figura 4.

Después del inicio de la Vacunación el paciente ha mostrado una estabilización de la enfermedad hasta el mes 19.

- 20 **Ejemplo 4: Esquema de Inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA 51 como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de ciclofosfamida en pacientes con cáncer.**

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

- 25 El paciente 4.1, JPG, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, células no pequeñas, enfermedad en progresión considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

- 30 Se trató con una dosis de 100 mg/kg peso corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF en un volumen total de 0.6 mls, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:400000, como se muestra en la Figura 5.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la enfermedad hasta el mes 6

Ejemplo 5: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con estabilización de la enfermedad en pacientes con cáncer.

En un ensayo Clínico Fase I, 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, fueron tratados con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

En el mismo ensayo otros 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, se inmunizaron con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF, en un volumen total de entre 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O. por encima del doble de la media de los blancos del ensayo).

En el referido ensayo el 50% de los pacientes desarrollaron una respuesta de anticuerpos con títulos de 1:4000 o mayores (grupo GAR). En el otro 50% de los pacientes los títulos alcanzados fueron menores de 1:4000 (grupo BAR).

Del grupo GAR, el 87.5% mostraron una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad igual o mayor a 3 meses, después de iniciado el tratamiento.

Del grupo BAR solo el 11.1% de los pacientes mostraron una estabilización clínica o y radiológica igual o mayor a 3 meses (Tabla 1).

Estos datos demuestran la relación existente entre los niveles de respuesta de anticuerpos anti-EGF y la estabilización tumoral.

5 Tabla 1: Relación de respuesta de anticuerpos y estabilización clínica y radiológica de la enfermedad.

	% de pacientes	Estabilización de al menos 3 meses, % de pacientes
GAR	50%	87.5%
BAR	50%	11.1%

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con la sobrevida de pacientes con cáncer sometidos a dicho tratamiento.

Cuarenta pacientes de NSCLC, estadios III y IV, fueron tratados en grupos de 10 con los esquemas detallados en los ejemplos 1,2,3 y 4.

Fueron caracterizados como GAR y BAR según los criterios expuestos en el ejemplo 6.

Del total de pacientes tratados en todos los esquemas, el 50% resulta ser GAR y el 50% BAR.

15 Al hacer una comparación de las sobrevidas alcanzadas por los pacientes GAR con las alcanzadas por los pacientes BAR, resultó haber una diferencia estadísticamente significativa, con una mediana de sobrevida (SV) para GAR de 9.1 meses, y una mediana de SV para BAR de 4.5 meses ($p<0.02$). Este resultado puede observarse en la Figura 6.

20 **Ejemplo 7: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:**

El paciente RML, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de base de lengua, etapa IV fue incluido en el ensayo clínico de uso combinado del AMC IOR-R3 y radioterapia (RTP). Recibió 6 veces la dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal. La dosis acumulada del AMC fue de 1200 mg y la dosis radiante fue de 60 Gy.

25 Al terminar la terapia combinada el paciente evidenció remisión completa del tumor primario y sus metástasis (Figura 7). Esta respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

Ejemplo 8: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente EPG, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de amígdala con adenopatías cervicales, etapa III, fue incluido en el ensayo de
5 tratamiento combinado del anticuerpo monoclonal humanizado hR3 (depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra) y RTP. Recibió 200 mg del AMC , con frecuencia semanal, durante 6 semanas, y una dosis radiante de 64 Gy.

Al finalizar el tratamiento, este paciente mostró remisión completa de la lesión tumoral (figura 8) y la respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

10 Ejemplo 9: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente CHA, diagnosticado como portador de tumor de amígdala, en etapa IV, con adenopatías cervicales bilaterales fue incluido en el ensayo de tratamiento combinado del hR3 y RTP. Recibió dosis de 400 mg con frecuencia semanal,
15 durante 6 semanas, para una dosis acumulada de 2400 mg. Concurrentemente recibió una dosis radiante de 64 Gy. Al finalizar el tratamiento este paciente se encontraba en remisión completa del tumor primario y las metástasis loco-regionales (Figura 9). Esta respuesta se mantiene por 12 meses.

20 Ejemplo 10: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF en paciente con tumor en estadio avanzado:

El paciente ARP, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, recibió un tratamiento combinado secuencial de AMC IOR-R3 y Vacuna EGF.

Recibió 6 dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal, durante 6 semanas,
25 conjuntamente con 30 dosis de radioterapia, 5 dosis por semana por 6 semanas, para una dosis radiante acumulada de 60 Gy.

Al finalizar el tratamiento estaba en remisión completa del tumor primario.

Un mes después de finalizado el tratamiento con el AMC, se inició un esquema de inmunización con la Vacuna EGF.

30 Recibió 5 dosis de 50 ug de EGF conjugado a P64, en un volumen total de 0.6 ml, mezclado hasta emulsificación con 0.6 ml de Montanido ISA 51 en el momento de la inmunización. Las inmunizaciones se realizaron en los días 1,7,14,21 y 51.

El paciente se mantiene en seguimiento.

Ejemplo 12: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF como terapia adyuvante:

El paciente MRM, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de pulmón, fue sometido a intervención quirúrgica.

- 5 Un mes después del acto quirúrgico, el paciente inició un tratamiento combinado simultaneando la inmunoterapia pasiva con el AMC IOR-R3 y la vacuna EGF. En la (Figura 12) se detalla el esquema de intervalos de dosificación del tratamiento recibido.

El paciente se encuentra en seguimiento.

10 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS:

Figura 1: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en paciente MMG, inmunizado según se detalla en el ejemplo 1. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

- 15 Figura 2: Cinética de respuesta de anticuerpos del paciente AMC, inmunizado según se detalla en el ejemplo 2. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

- Figura 3: Regresión tumoral observada en el paciente AMC. En la imagen de la izquierda se observa masa tumoral existente al inicio del tratamiento. En la imagen de la derecha se observa que a los 12 meses de iniciado dicho tratamiento la masa
20 tumoral había desaparecido.

Figura 4: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en el paciente FNR, inmunizado según se detalla en el ejemplo 3. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

- Figura 5: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF del paciente JPG, inmunizado según se detalla en el ejemplo 4. Las flechas indican tiempos en que se
25 realizaron re-inmunizaciones.

Figura 6: La figura muestra las curvas Kaplan Meyer de los grupos de pacientes con altas respuestas anti-EGF (GAR) y con bajas respuestas anti-EGF (BAR), así como la de un grupo control histórico.

- 30 Puede observarse que los GAR presentan un incremento de sobrevida significativo comparados tanto con GAR como con los controles históricos.

Figura 7: Demostración gráfica de remisión del tumor en paciente RML, tratado como se detalla en ejemplo 7.

Figura 8: Demostración gráfica de regresión tumoral en paciente EPG tratado según se detalla en el ejemplo 8.

Figura 9: Demostración gráfica del tumor en paciente CHA, tratado como se detalla en el ejemplo 9.

- 5 **Figura 10: Grupos de ratones inmunizados con 0.5 mg de cada uno de los AMC IOR-R3 , EGF-1, y con la combinación de 0.5 mg de IOR-R3 + 0.5 mg de EGF1, como se detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.**

- Figura 11: Grupos de ratones inmunizados con 1mg de cada uno de los AMC IOR-R3 , EGF-1, y con la combinación de 1 mg de IOR-R3 + 1 mg de EGF1, como se**
10 **detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.**

Figura 12: Tratamiento combinado conjunto del AMC IOR-R3 y la Vacuna EGF:

- Las flechas por encima del eje de tiempo significan las fechas de administración del**
15 **AMC (días 1,7,14,21,28 y 35) y las flechas por debajo del eje de tiempo significan los tiempos de las inmunizaciones con la Vacuna EGF (días 2,8,15,22,y 52).**

REIVINDICACIONES

1. Un juego de reactivos Inmunoterapéutico para el tratamiento de tumores donde la combinación de dichos reactivos tiene efecto sobre células cuyo crecimiento es dependiente del sistema de receptores RTK, caracterizado porque ésta comprende los componentes A, B, C y D, los cuales son usados simultánea o secuencialmente en las combinaciones de A + C; ó A + D; ó B + C; ó B + D, donde A, B, C y D son:
 - A.- Un anticuerpo contra un receptor RTK;
 - B.- Un anticuerpo contra el(los) ligando(s) del receptor RTK;
 - 10 C.- Una vacuna cuyo principio activo es un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dicho receptor RTK;
 - D.- Una vacuna cuyo principio es el(los) ligando(s) de un receptor de RTK, el cual induce anticuerpos contra dichos ligando(s) del receptor RTK;
2. Un juego de reactivos según la reivindicación 1 donde el anticuerpo monoclonal contra el receptor RTK es un anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF.
3. Un juego de reactivos según la reivindicación 2 donde el anticuerpo contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, R-EGF, es un anticuerpo humanizado.
- 20 4. Un juego de reactivos según la reivindicación 3 donde el anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF es el hR3, depositado con número de acceso 951110101 en ECACC, Inglaterra.
5. Un juego de reactivos según la reivindicación 1 donde el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK es un anticuerpo contra el EGF.
- 25 6. Un juego de reactivos según la reivindicación 1 donde el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK es un anticuerpo contra el TGF alfa.
7. Un juego de reactivos según la reivindicación 1 donde el principio activo de la vacuna es el receptor del EGF.
8. Un juego de reactivos según la reivindicación 1 donde el principio activo de la vacuna es el EGF.
- 30 9. Un juego de reactivos según la reivindicación 8 donde el principio activo de la vacuna comprende un conjugado entre la proteína p64K de *Neisseria meningitis* y el EGF.

10. Un juego de reactivos según la reivindicación 1 donde el principio activo de la vacuna es el TGF alfa.
11. Un juego de reactivos según la reivindicación 10 donde la vacuna comprende como principio activo un conjugado entre la proteína p64K de *Neisseria meningitidis* y el TGF alfa.
- 5

RESUMEN

La presente invención se relaciona con el campo de la Inmunología y más específicamente con la inmunoterapia del cáncer, particularmente con un juego de reactivos inmunoterapéuticos y el empleo de combinaciones de dichos reactivos para impedir el crecimiento de células tumorales y/o eliminar dichas células.

Los métodos descritos en la presente invención se basan en el bloqueo de receptores con actividad de proteínas quinasas en residuos de tirosina (RTK) y de ligandos para dichos receptores.

- 10 Se describen combinaciones inmunoterapéuticas que provocan el bloqueo de receptores RTK y/o sus ligandos, mediante la combinación de inmunoterapia activa y/o pasiva contra los mismos y los procedimientos referidos pueden ser aplicados a pacientes en diferentes estadios clínicos de tumores de origen epitelial que sobre-expresan estos receptores. La combinación de inmunoterapia activa y pasiva puede
- 15 ser simultánea o secuencial en dependencia de si el procedimiento terapéutico va a ser utilizado en pacientes con enfermedad avanzada o como terapia adyuvante.

IMMUN THERAPEUTIC KIT FOR THE TREATMENT OF TUMORS.**Technical Field:**

This invention relates to immunology, and especially to cancer immunotherapy; and particularly provides an immunotherapeutic kit for inducing a low growth rate and/or removing tumoral cells.

Prior Art:

The system of the EGF receptor (EGF-R) and its ligands constitutes a molecular complex whose interaction regulates in a specific way cellular growth and its impact has been demonstrated in the uncontrolled growth of tumors of epithelial cell origin. During tumorigenesis the paracrine and autocrine control of EGF-R activation is deregulated, due to growth factor over-production, because of the high rate of synthesis and/or receptor mutations.

The EGF-R is a transmembrane glycoprotein with 1186 amino acids and 170 kD molecular weight that it is broadly expressed in normal tissues. It has been implicated in several stages of embryogenic development.

The binding of its specific ligands, EGF or TGF- α , induces receptor dimerization, as well as heterodimerization with other members of the ErbB family, like HER-2 (Cohen BD et al. (1996) J Biol Chem 271:7620-7629). The binding of ligand to receptors releases a cascade of intracellular signals (Ullrich TO and Schlessinger J (1990) Cell 61:203-212) that drives cellular growth and differentiation. Overexpression of the receptor occurs in some types of cancers, mainly of epithelial origin, which has been a target for cancer immunotherapy. Such is the case for breast, bladder, ovary, uterine, colon, lung, brain, prostate and head and neck tumors. EGF-R expression has proven to be an indication of bad prognosis in breast cancer (Pérez R et al. (1984) Breast Cancer and Treatment 4:189-193). While the role of EGFR and its ligands in tumor growth is not yet known, there are suggestions that EGF-R expression in tumor cells induces a mechanism for autocrine stimulation that leads to uncontrolled proliferation of those cells (Schlessinger J et al. (1983) Crit Rev Biochem 14 (2):93-111).

The main ligands of this system are the Epidermal Growth Factor (EGF) and the Transforming Growth Factor alpha type (TGF α). There are other ligands belonging to the EGF superfamily, like: amphireguline (AR), crypto-1 (CR1), Heparin Growth Factor, betacellulin, epiregulin, and others.

EGF is a 53 amino acid polypeptide with a molecular weight of 6045Da, which is mitogenic for cells of epithelial origin. Its action is mainly paracrine through its binding to EGF-R.

TGF α is a 50 amino acid polypeptide able to compete with EGF for binding to EGF-R. Anti-EGF antibodies are not able to recognize TGF α (Todaro G J et al. (1976), Nature

264:26-31), meaning that both growth factors are two⁵ immunologically different entities.

The EGFR - ligand system has been the target of passive immunotherapy (PI) using monoclonal antibodies (Mab) against EGF-R, in native form, associated with drugs, toxins, or radioactive isotopes (Vollmar AM et al. (1987) J Cell Physiol 131:418-425) in tumors with
5 high expression of this receptor. These antibodies have been selected by their capacity to inhibit the binding of EGF to its receptor (neutralizing antibodies). Several clinical trials with Mabs are being carried out and some have shown promising results as it is the case of Phase II clinical trials with the Mab C225 in breast, pancreatic and renal cancer, in addition to Phase III trials in head and neck cancer (Mendelsohn, J et al. (1999) American Society of
10 Clinical Oncology Meeting). Other Phase II clinical trials showing good results have been carried out with the Mab IOR-R3 in lung tumors (Crombet T et al. (2000) Cancer Biotherapy and Biopharmaceutical, manuscript accepted for publication).

Passive immunotherapy with the IOR-R3 Mab (EP586002B1), specific against the EGF-R, has demonstrated that the specific binding of the IOR-R3 to the receptor inhibits EGF/EGF-R
15 binding, with subsequent inhibition of EGFR autophosphorylation. In turn, passive immunotherapy with IOR-R3 inhibited the growth of human tumor cells in nude mice, and it has reduced the rate of tumor growth in some patients in clinical trials. This system has also been target of specific active cancer immunotherapy. One example is the use of a vaccine composed of one of the main ligands of EGF-R, EGF, coupled to a carrier protein (US
20 5,894,018). This vaccine is able to induce a specific antibody response against autologous EGF, to inhibit EGF/EGF-R binding, thus blocking proliferation mechanisms induced by this binding. Pre-clinical studies have shown that mice immunized with autologous EGF coupled to a carrier protein and administered with a useful adjuvant, increases survival of mice transplanted with Ehrlich Ascitic Tumor (EAT) cells (González G et al. (1996), Vaccine
25 Research 5(4):233-243; González G et al (1997) Vaccine Research 6(2):91-100).

Results from a Phase I clinical trial have been reported for a vaccine containing human recombinant EGF, demonstrating the immunogenicity and safety of vaccination (González G et al (1998), Annals of Oncology 9:1-5).

Disclosure of the invention:

30 The present invention intends the use of combined immunotherapies, directed against the receptors with tyrosine kinase activity (RTK) and against their ligands, in order to potentiate the effect observed when applying in an independent way the different immunotherapies forms described in the state of the art, directed against only one of the components of the receptor/ligand system. This potentiation is justified for the combined blockade of both,
35 ligands and receptor, in a treatment method that includes both active principles.

Particularly the invention refers an immunotherapeutic kit for the treatment of tumors

whose effect is on cells whose growth is dependent of the system of receptors with tyrosine kinase activity, characterized in that it comprises the components A, B, and D, which are used simultaneous or sequentially in the combinations of A + C; r A + D; or B + C; or B + D; wherein A, B, C and D are:

- 5 A. - An antibody against a receptor RTK;
B. - An antibody against the ligand(s) of the receptor RTK;
C. - A vaccine comprising a receptor RTK, which induces antibodies against said receptor RTK;
D. - A vaccine comprising the ligand(s) of a receptor RTK, which induces antibodies against
10 said ligand(s);

In a preferred embodiment of the invention, the monoclonal antibody against the receptor RTK is an antibody against the receptor of the Epidermal Growth Factor, R-EGF, and more specifically it is the antibody humanized against the EGF-R, the hR3, deposited with access number 951110101 in ECACC, England.

- 15 In another embodiment of the invention the antibody against the ligand of the receptor RTK can be an antibody against the EGF or against the TGF alpha.

Also the invention refers to an immunotherapeutic kit which comprises a vaccine containing as active principle the EGF-R, EGF, TGF alpha, or a conjugated of these molecules with the protein p84K of *Neisseria meningitis*.

- 20 The immunotherapeutic kit of the instant invention in the combinations proposed inhibit growth of tumor cells to eliminate those cells, based on the blockade of RTK receptors and its ligands. This blockade can be achieved, among other approaches, using combination, simultaneous or sequential, of active immunotherapies (therapeutic vaccines) and passive immunotherapies (Mab) directed to growth factors (i.e. EGF, TGF α) and its
25 receptors (i.e. EGF-R).

The blockade of growth factors or of their receptors causes inhibition of cellular proliferation. In this invention we show that simultaneous blockade of ligands and/or receptors potentiate the inhibition effect on cellular proliferation. This therapeutic concept is of great importance for treatment of malignant tumors, which are fundamentally caused by an increase in the rate
30 of cellular proliferation.

Immunotherapeutic combinations of the components of the kit described cause the blockade of RTK receptors and/or their ligands, by means of active and passive immunotherapeutical combinations.

- The referred procedures can be applied to patients with tumors of epithelial origin that over-
35 express EGF-R, in different clinical stages.

The combination of active and passive immunotherapy can be simultaneous or sequential,

independent of the therapeutic procedure used in patients with advanced disease, or as adjuvant therapy.

In cases of advanced disease, the proposed therapeutic combination is passive immunotherapy with Mab that recognizes the RTK receptor and/or Mab that recognizes ligands of this receptor, in combination with an onco-specific therapy of choice, as first line therapy, followed by active immunotherapy using vaccines directed against the ligands of the receptor and/or to the receptor, to maintain the therapeutic effect.

In cases of adjuvant therapy the proposed therapeutical combinations are; passive immunotherapy with Mab that recognize either, the RTK receptor and/or its ligands with active immunotherapy using vaccines directed to the receptor's ligands or to the receptor itself. Or passive immunotherapy with Mab that recognize either, the RTK receptor or its ligands as attack therapy, followed by active immunotherapy with vaccines directed to the receptor's ligands or to the receptor itself, as maintenance treatment.

The way to use the kit of the invention is explained in the procedures presented below.

PROCEDURE 1: Therapeutic combination including passive immunotherapy with Mab that recognize the RTK receptor (i.e. EGF-R) and/or the receptor's ligands (i.e. EGF, TGF alpha), followed by active therapy with vaccines directed to the receptor and/or its ligands, to be applied in patients with advanced stage epithelial tumors.

This is administered to patients with advanced cancer who are not eligible for any other onco-specific therapy.

The first treatment step will be passive immunotherapy with Mab that recognizes the RTK receptor (i.e. EGF-R), with the property of inhibiting this receptor and/or Mab that recognize the receptors ligands (i.e. EGF, TGF alpha). This will be an acute therapy aimed at the goal of tumor remission, and can be used together with the established onco-specific treatment for this stage of disease.

This will be followed by active immunotherapy using vaccines that induce receptor blocking antibodies (i.e. anti-EGF-R) and/or ligand blocking antibodies (i.e. anti-EGF, anti-TGF alpha), with the objective of maintaining disease stabilization for longer periods, to avoid new metastases.

The procedure consists of administration to patients in advanced stages of tumors of epithelial origin, of between 4 and 20 doses, ranging between 100 and 400 mg of a Mab that recognizes and inhibits EGF-R, and/or MAb that recognizes the receptor's ligands. The time between doses will be between 6 to 10 days. The complete treatment can last between 1 to 24 months, concomitant with the established onco-specific therapy. The treatment will continue up to partial or complete tumor regression or up to the point where an adverse reaction occurs that requires treatment cessation.

Between 1 and 4 weeks after this treatment, immunization schedules will be initiated with vaccines directed against EGF-R or its ligands (i.e. EGF, TGF-alpha) coupled to a carrier protein (i.e. P64K *Neisseria meningitidis* recombinant protein) and administered in an adequate adjuvant i.e alum (between 1 and 2 mg/dose) or Montanide ISA 51 (between 0.6 and 1.2 ml/dose). Each dose contains between 50 and 800 ug of active ingredient (receptor or ligand) coupled to the carrier protein, in a final volume of between 0.6 and 5 mL. The immunization schedule is 5 to 8 initial immunizations for response induction, given every 7 to 15 days. Immunizations can be preceded by administration of cyclophosphamide, between 100 and 500 mg/m² of body weight, administered 2 to 4 days before the 1st immunization.

Vaccines can be formulated in any other vaccine vehicle (i.e. liposomes, DNA vaccines, viral vectors).

Vaccines can be formulated as independent products or as a unique vaccine formulation.

In this period, blood will be extracted from patients in order to measure biochemical blood markers and specific antibody titers against the ligand or receptor to which the vaccine is directed. Extractions will be done weekly or monthly.

Subsequently, re-immunizations will be done if antibody titers decrease, every 1 to 3 months for a period of 1 to 2 years.

PROCEDURE 2: Immunotherapeutic combination including passive immunotherapy with Mab that recognizes a RTK receptor (i.e. EGF-R) and/or its ligands (i.e. EGF, TGF alpha) together with active immunotherapy with vaccines directed against the receptor and/or its ligands, as adjuvant treatment.

Passive treatment with Mab recognizing a RTK receptor (i.e. EGF-R) inhibiting its activity and/or Mab recognizing receptor's ligands (i.e. EGF, TGF alpha), together with an active treatment with vaccines that induces an antibody response that blocks the receptor and/or its ligands, will be administered to patients immediately after diagnosis and/or surgical treatment.

Those treatments, administered together, will have a synergistic effect, enabling a higher percentage of regression and/or clinical disease stabilization.

Patients with tumors of epithelial origin are amenable to this treatment, that consists of between 4 to 20 doses, ranging between 100 and 400 mg, of Mab recognizing and inhibiting RTK receptors and/or its ligands. The time between doses will be between 6 to 10 days and the treatment can last between 1 to 24 months. The treatment will continue until partial or complete tumor regression or up to the point where an adverse reaction occurs that requires treatment cessation.

Concomitant immunizations will be administered with vaccines according to the schedule described in procedure #1.

PROCEDURE 3:

Immunotherapeutic combination including passive immunotherapy with Mab recognizing RTK receptors (i.e. EGF-R) and/or its ligands (i.e. EGF, TGF alpha), followed by active immunotherapy with vaccines directed against the receptor and/or its ligands, to be applied as adjuvant therapy.

This will be applied to patients immediately after diagnosis and/or surgical treatment.

The goal of this treatment is to use acute therapy to obtain tumor remission, via initial passive immunotherapy with Mab recognizing and inhibiting RTK receptors (i.e. EGF-R) and/or Mab recognizing its ligands (i.e. EGF, TGF alpha). Subsequently, active immunotherapy will be initiated using vaccines inducing blocking antibodies against the receptor (i.e. EGF-R) or its ligands (i.e. EGF, TGF alpha). The aim of the 2nd treatment is to obtain a longer period of freedom from disease, to avoid the appearance of new metastases.

The procedure consists of administration to patients at advanced stages of cancer of epithelial origin, from 4 to 20 doses of between 100 and 400 mg of Mab that recognizes and inhibits the EGF-R and/or its ligands. The time between doses will be between 6 to 10 days and the treatment duration can be between 1 to 24 months. The treatment will continue until partial or complete tumor regression, or until any adverse reaction occurs that requires treatment cessation.

Between 1 to 4 weeks after the end of treatment, immunization schedules will begin with vaccines directed against the EGF-R or some EGF-R ligand (i.e. EGF, TGF alpha), according to the schedule described in procedure #1.

EXAMPLES:

Example 1: Immunization schedule with EGF vaccine in cancer patients, using alum as adjuvant.

With the main goal of demonstrating immunogenicity and safety of EGF, a clinical trial was performed in which 10 patients were immunized with an EGF Vaccine (US 5,894,018), using P64K as carrier protein and alum as adjuvant.

Patient 1.1 (MMG) was included in the trial with a diagnosis of metastatic epidermoid carcinoma of the lung, with progressive disease, and not eligible for any other onco-specific treatment.

The patient was immunized following a schedule of 5 initial dose of the vaccine, containing 50ug of EGF and 2 mg alum, administered on days 1, 7, 14, 21 and 51.

Blood extraction was performed on days 0, 15, 30, 45, 60 and monthly thereafter for blood biochemical measurements and for EGF- specific antibodies.

Antibody titers were measured by means of an ELISA test, antibody titers being determined as the maximal sera dilution that gives a positive result in the ELISA test. (O.D values equal

or higher 2 times the blank).

Re-immunization was performed using the same vaccine dose when a decrease in antibody titers was detected.

Patient MMG developed an anti-EGF antibody response with maximum titers up to 1:8000.

5 The kinetics of the antibody response is shown in figure 1.

After the beginning of the vaccination schedule the patient showed clinical and radiological stabilization of disease for 15 months. The patient died 23.2 months after the first vaccination.

10 **Example 2: Immunization schedule with EGF vaccine in cancer patients, using Montanide ISA 51 as adjuvant.**

With the main goal of demonstrating immunogenicity and safety of EGF using P64K as a carrier protein and Montanide ISA 51 as an adjuvant, a clinical trial was performed in which 10 patients were immunized.

15 Patient 2.1 (AMG) was included in the trial with a diagnosis of epidermoid carcinoma of the lung, with progressive disease, being ineligible for any other onco-specific treatment.

The patient was immunized according to a schedule of 5 initial doses of the vaccine containing 50ug of EGF in 0.6 mL total volume, emulsified with 0.6 mL of Montanide ISA 51 immediately before use, and administered on days 1, 7, 14, 21 and 51.

20 Blood extractions were performed on days 0, 15, 30, 45, 60 and monthly thereafter for blood biochemical measurements and measurement of specific anti-EGF antibodies.

The antibody titers were measured by means of an ELISA test, antibody titers being determined as the maximal sera dilution that gives a positive result in the ELISA test. (O.D values equal or higher 2 times the blank).

25 Re-immunization was performed using the same vaccine dose when a decrease in antibody titers was detected.

Patient AMG developed an anti-EGF antibody response with maximum titers of up to 1: 32000, with kinetics of response shown in figure 2.

After the beginning of the vaccination schedule, the patient showed stabilization of disease for 12 months, at which point clinical and radiological tumor regression was diagnosed.

30 On the 14th month after the beginning of vaccination, a 2nd primary tumor appeared. The patient died 18 months after inclusion from a surgical complication of this 2nd tumor.

Example 3: Immunization schedule in cancer patients, with EGF vaccine, using alum as adjuvant and low dose cyclophosphamide pre-treatment.

35 A clinical trial was carried out in which 10 patients were immunized with the main goal of demonstrating immunogenicity and safety of the EGF Vaccine using P64K as carrier protein and alum as adjuvant after cyclophosphamide pre-treatment.

AMENDED SHEET

Patient 3.1, FNR, was included in the trial with a diagnosis of epidermoid carcinoma of the lung, with progressive disease, being ineligible for any other onco-specific treatment.

The patient was treated with cyclophosphamide (100 mg/m² of body surface), 3 days before the first immunization of the EGF Vaccine. The vaccination schedule was 5 doses of the vaccine composition, containing 50 ug of EGF and 2 mg of alum, administered on days 1, 7, 14, 21 and 51.

Blood extractions were performed on days 0, 15, 30, 45, 60 and then monthly for blood chemistry and specific anti-EGF antibody determinations.

Antibody titers were measured by means of an ELISA test, antibody titers being determined as the maximal sera dilution that gives a positive result in the ELISA test (O.D values equal or higher 2 times the blank).

Re-immunization was performed using the same vaccine dose, when a decrease in antibody titers was detected.

The patient developed an anti-EGF antibody response with maximum titers up to 1:8000, as shown in figure 4.

After the beginning of the vaccination schedule, the patient showed disease stabilization for 19 months.

Example 4: Immunization schedule with EGF vaccine in cancer patients, using Montanide ISA 51 as adjuvant and cyclophosphamide pre-treatment.

A clinical trial was carried out in which 10 patients were immunized with the main goal of demonstrating immunogenicity and safety of the EGF Vaccine, using P64K as carrier protein and and Montanide ISA 51 as adjuvant after low-dose cyclophosphamide pre-treatment. Patient 4.1, JPG, was included in the trial with a diagnosis of non-small cell lung adenocarcinoma, with progressive disease, being ineligible for any other onco-specific treatment.

The patient was treated with cyclophosphamide (100 mg/kg of body weight), 3 days before the first immunization of the EGF Vaccine. The vaccination schedule was 5 doses of the vaccine composition, containing 50 ug of EGF in 0.6 mL total volume, emulsified with 0.6 mL of Montanide ISA 51 immediately before use, administered on days 1, 7, 14, 21 and 51.

Blood extractions were performed on days 0, 15, 30, 45, 60 and then monthly for blood chemistry and specific anti-EGF antibody determinations.

Antibody titers were measured by means of an ELISA test, antibody titers being determined as the maximal sera dilution that gives a positive result in the ELISA test (O.D values equal or higher 2 times the blank).

Re-immunization was performed, using the same vaccine dose, when a decrease in antibody titers was detected.

AMENDED SHEET

Patient JPG developed an anti-EGF antibody response with maximum titers up to 1:400000, as shown in figure 5.

After the beginning of the vaccination schedule the patient showed disease stabilization for 6 months.

5 **Example 5: Immunogenicity of EGF vaccination and its relationship to disease stabilization in patients with cancer.**

In a Phase I trial, 10 patients at stages III or IV of Non Small Cell Lung cancer (NSCLC), were treated with 5 initial doses of vaccine composition containing 50ug of EGF and 2 mg of alum, administered on days 1, 7, 14, 21 and 51.

10 The other 10 patients (NSCLC, stages III or IV), were immunized with 5 doses of the vaccine composition containing 50 ug of EGF, in a total volume of 0.6 mls, emulsified with the same volume (0.6 mL) of Montanide ISA 51.

Antibody titers were measured by means of an ELISA test, with antibody titers determined as the maximal sera dilution that gives a positive result in the ELISA test. (O.D values equal or
15 higher 2 times the blank).

In this trial, 50% of patients developed an anti-EGF antibody response with antibody titers of 1:4000 or higher (, Good Antibody Responders, GAR group) and 50% antibody titers below 1:4000 (Bad Antibody Responders, BAR group).

In the GAR group, 87.5% of patients showed clinical and radiological disease stabilization for
20 at least 3 months after the beginning of treatment.

In the BAR group, only 11.1% of patients showed this stabilization profile (Table 1).

These data demonstrate the relationship between anti-EGF antibody levels and tumor stabilization.

Chart 1: Relationship of antibody responses and clinical and radiological disease
25 stabilization.

	% of patients	Disease stabilization for at least 3 months after beginning treatment.
GAR	50%	87.5%
BAR	50%	11.1%

30 **Example 6: Immunogenicity of EGF vaccination and relationship to survival of cancer patient subjected to this treatment.**

Forty stage III /IV NSCLC patients were treated, in groups of 10, with the schedules detailed in examples 1,2,3 and 4.

They were characterized as GAR and BAR according to criteria exposed in example 6.

Of the total of patients treated with the previously described schedules, 50% turned out to be

5 GAR and 50% BAR.

When survival patterns were compared between GAR and BAR patients, a statistically significant difference was observed, with a mean survival of 9.1 months for GAR and a mean survival of 4.5 months for BAR ($p < 0.02$). This result is showed in figure 6.

Example 7: Therapeutic effect of the combination of Radiotherapy and Mab IOR-R3:

10 Patient RML, diagnosed with stage IV tongue base epidermoid carcinoma, was included in the clinical trial using the combination of radiotherapy (RTP) and IOR-R3. The patient received 200 mg of Mab once a week for 6 weeks. The accumulated dose of Mab was 1200mg and the total radiation dose was 60 Gy.

15 When the combination therapy was complete the patient showed complete remission of the primary tumor and its metastases (figure 7). This response was maintained for more than 13 months.

Example 8: Therapeutic effect of the combination of Radiotherapy and Mab IOR-R3:

20 Patient EPG, diagnosed with stage III tonsil epidermoid carcinoma with cervical adenopathies, was included in the clinical trial using the combination of radiotherapy (RTP) and IOR-R3. The patient received 200mg of Mab once a week for 6 weeks and a total radiation dose of 64 Gy.

After treatment, this patient showed complete remission of the tumor lesion (figure 8). The response was maintained for more than 13 months.

Example 9: Therapeutic effect of the combination of Radiotherapy and Mab IOR-R3:

25 Patient CHA, diagnosed with a stage IV tonsil tumor, with bilateral cervical adenopathies, was included in the clinical trial using a combination of radiotherapy (RTP) and IOR- R3. The patient received 400 mg of Mab once a week for 6 weeks, for an accumulated dose of 2400 mg. Concomitantly, the patient received a total radiation dose of 64Gy.

30 When concluding the treatment this patient was in complete remission of the primary tumor and the loco-regional metastasis (figure 9). The response was maintained for 12 months.

Example 10: Schedule of combined Mab IOR-R3 / EGF vaccine treatments in patients with advanced stage tumors:

Patient ARP, diagnosed with epidermoid carcinoma of the head and neck, received sequential treatment of Mab IOR-R3 and EGF Vaccine.

35 The patient received 200 mg of Mab once a week for 6 weeks, in combination with a total of 30 doses of radiotherapy, 5 doses per week for 6 weeks, for an accumulated radiation dose

of 60 Gy.

When concluding the treatment, the patient was in complete remission of the primary tumor. An immunization schedule with the EGF Vaccine began one month after conclusion of the treatment with the Mab. The patient received 5 doses of 50 ug of EGF conjugated to protein P64k, in a total volume of 0.6 mls, emulsified with 0.6 ml of Montanide ISA 51 immediately before use. The immunizations were carried out on days 1,7,14,21 and 51.

The patient remains in the follow-up period.

Example 11: Schedule of combined Mab IOR-R3 / EGF vaccine treatments in patients with advanced stages tumors:

- 10 Patient MRM, diagnosed with epidermoid carcinoma of the lung, was subjected to surgical intervention. One month after the surgery the patient began a combined treatment of passive immunotherapy with Mab IOR-R3 concomitantly with the EGF vaccine.

Figure 10 details the schedule of dose intervals. The patient is in follow up.

BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES:

- 15 Figure 1: Kinetics of anti-EGF antibody response in patient MMG, immunized as detailed in example 1. Arrows indicate times of re-immunizations.

Figure 2: Kinetics of anti-EGF antibody response in patient AMC, immunized as detailed in example 2. Arrows indicate times of re-immunizations.

- 20 Figure 3: Tumor regression observed in patient AMC. The tumor mass is seen on the left at the start of treatment. On the right of the figure it can be seen that 12 months after the start of treatment the tumor mass disappeared.

Figure 4: Kinetics of anti-EGF antibody response in patient FNR, immunized as detailed in example 3. Arrows indicate times of re-immunizations.

- 25 Figure 5: Kinetics of anti-EGF antibody response in patient JPG, immunized as detailed in example 4. Arrows indicate times of re-immunizations.

Figure 6: Kaplan-Maier survival curves of groups of patients with high anti-EGF antibody response (GAR) and with low anti-EGF antibody responses (BAR), as well as that of a historical control group.

- 30 As can be seen, GAR is associated with a significant increase in survival compared with either BAR or with historical controls.

Figure 7: Graphic demonstration of tumor remission in patient RML, treated as detailed in example 7.

Figure 8: Graphic demonstration of tumor regression in patient EPG, treated as detailed in example 8.

- 35 Figure 9: Graphic demonstration of the tumor in patient CHA, treated as detailed in example 9.

Figure 10: Combined treatment of Mab IOR-R3 and the EGF Vaccine:

Arrows above the time axis indicate the day of Mab administration (days 1,7,14,21,28 and 35) and arrows below the time axis indicate the day of immunization with the EGF Vaccine (days 2,8,15,22, and 52).

CLAIMS:

1. An immunotherapeutic kit for the treatment of tumors whose effect is on cells whose growth is dependent of the system of receptors with tyrosine kinase activity, characterized in that it comprises the components A, B, C and D, which are used simultaneous or sequentially in the combinations of A + C; or A + D; or B + C; or B + D; wherein A, B, C and D are:
 - A. - An antibody against a receptor with tyrosine kinase activity;
 - B. - An antibody against the ligand(s) of the a receptor with tyrosine kinase activity;
 - 10 C. - A vaccine comprising a receptor with tyrosine kinase activity, which induces antibodies against said receptor;
 - D. - A vaccine comprising the ligand(s) of a receptor with tyrosine kinase activity, which induces antibodies against said ligand(s).
2. Immunotherapeutic kit according to claim 1 wherein the antibody against the receptor with tyrosine kinase activity an antibody against the EGF receptor.
3. Immunotherapeutic kit according to claim 2 wherein antibody against the EGF receptor is a humanized antibody.
4. Immunotherapeutic kit according to claim 3 wherein the humanized antibody against the EGF receptor is IOR R3, deposited with accession number 951110101 en ECACC,
20 Inlaterra.
5. Immunotherapeutic kit according to claim 1 wherein the antibody against the ligand(s) of the receptor with tyrosine kinase activity is an antibody against EGF.
6. Immunotherapeutic kit according to claim 1 wherein the antibody against the ligand(s) of the receptor with tyrosine kinase activity is an antibody against TGF alpha.
- 25 7. Immunotherapeutic kit according to claim 1 wherein the vaccine comprises the EGF receptor as active principle.
8. Immunotherapeutic kit according to claim 1 wherein the vaccine comprises EGF as active principle.
9. Immunotherapeutic kit according to claim 8 wherein the vaccine comprises as immunogen conjugated proteins EGF and P64K from *Neisseria meningitidis*.
- 30 10. Immunotherapeutic kit according to claim 1 wherein the vaccine comprises the TGF alpha as active principle.
11. Immunotherapeutic kit according to claim 10 wherein the vaccine comprises as immunogen conjugated proteins TGF alpha and P64K from *Neisseria meningitidis*.

