



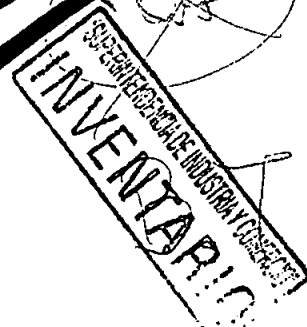
Organización
Digitalización CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones



PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-133771

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

TRATAMIENTO DE TUMORES EN PACIENTES PEDIATRICOS CON ANTAGO-
NISTAS DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL 51 A 61K 39/395

71. SOLICITANTE IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED

DOMICILIO 180 Varick Street, New York, N.Y. 10014, Estados Unidos

74. APODERADO Luz Helena Villami Jiménez

22. BOGOTÁ, D. C., Diciembre 17 de 2008



No. 08-133771- -00000-0000

Fecha: 2008-12-17 11:42:25 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eje: 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 61

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ X

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒ X

Capítulo I

☐

Capítulo II

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED**

Dirección: 180 Varick Street, New York, N.Y. 10014

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____
Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **LUZ HELENA VILLAMIL JIMÉNEZ**

Dirección: Calle 93-A No. 14-17 Oficina 609

Teléfono: 256-3401

Fax: 601-9522

E-Mail: luzvillamil@villamil-ip.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ X

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual 41750053
Número TP 29882

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: **ROWINSKY, Eric**

Dirección: 5 Robin Road, Warren, NJ 07059

Nacionalidad y Domicilio: Estados Unidos de América

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/074448

Fecha 26 July 2007

Publicación Internacional No. WO/2008/014386

Fecha Enero 31, 2008

⑥

Título(54):

**TRATAMIENTO DE TUMORES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR
DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO**

⑦

Clasificación Internacional (51): A 61K 39/395

⑧

Prioridad

SI ☒ X NO ☐

(33) País de Origen

USA

(32) Fecha

Julio 27, 2006

(31) N° de Solicitud

60/833,487

⑨

Comprobante de Pago No.: 08-95,383

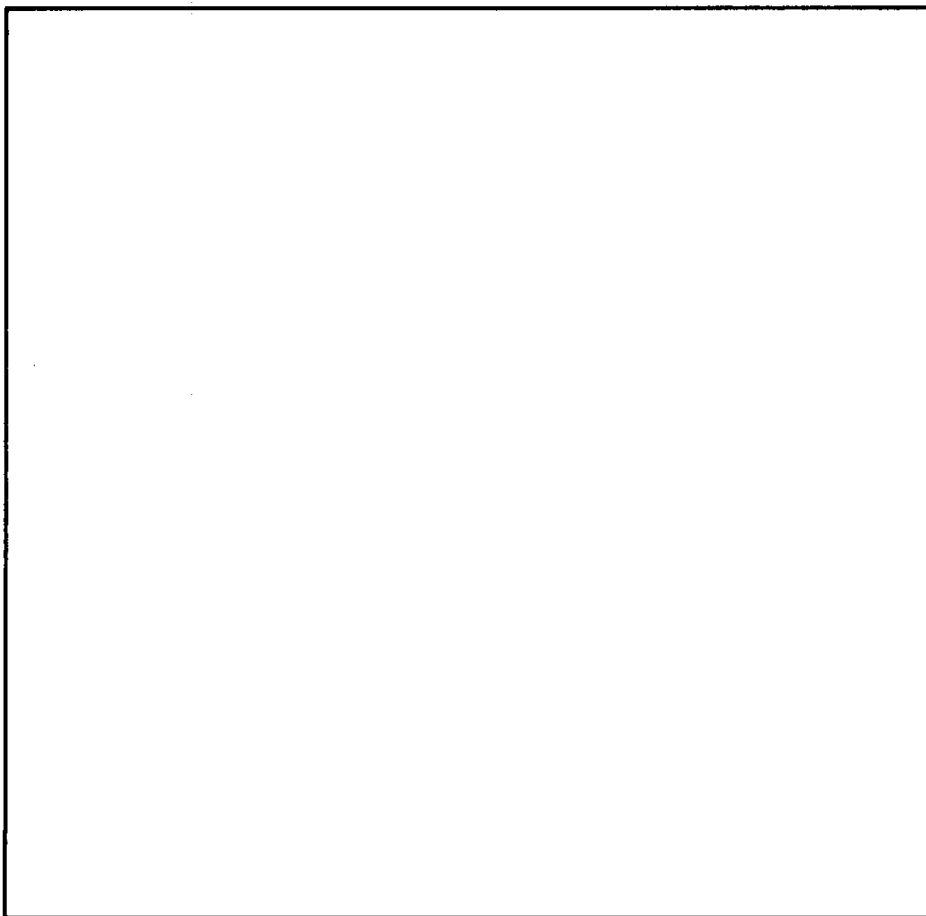
Fecha Diciembre 10, 2008

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 fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia 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. Listas de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos

11 FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la Concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ HELENA VILLAMIL JIMENEZ

FIRMA:

Luz Helena Villamil Jimenez

C.C. 41750053 BTA TP. 29882

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 049/2008 de un documento escrito en inglés, hecha el día 30 de septiembre de 2008 por Luz Helena Villamil Jiménez, traductora oficial con cédula de ciudadanía No. 41.750.053 de Bogotá y con Licencia de Traductora expedida por el Ministerio del Interior y de Justicia por Resolución No. 0754 de fecha 18 de mayo de 2004.

PODER

APOSTILLA
(CONVENCION DE LA HAYA DE OCTUBRE 5 DE 1.961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2. ESTE DOCUMENTO PUBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
ANGELA SACCA
3. ACTUANDO EN CALIDAD DE:
NOTARIO PUBLICO DE NEW JERSEY
4. LLEVA EL SELLO / ESTAMPILLA DE:
ANGELA SACCA, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NEW JERSEY
6. EL DIA 14 DE AGOSTO DE 2008
7. POR: R. David Rousseau, TESORERO DE NEW JERSEY
8. NO. A336749
9. SELLO / ESTAMPILLA:

(Sello Dorado)
Del Estado de New Jersey
10. FIRMA
Como Notaria Veinticinco del Circuito de Bogotá certifico que, previo el cotejo respectivo, la pre(firmado) coincide exactamente con el original leído a la vista.
11 DIC. 2008
WILMA ZAFRA JIMENEZ
NOTARIA VEINTICINCO

DOCUMENTO REGISTRADO
LAS FUNCIONES INDICADAS

127108
Luz Helena Villamil
2008 NOV -4 A 10:36
CMBQ

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

Escribo 81141027 19305

LUZ HELENA VILLAMIL J.
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES No. 0754 - MAYO 18/2004
MIN. DEL INTERIOR Y DE JUSTICIA

Luz Helena Villamil

En la segunda página se encuentra el **Poder** otorgado el 11 de agosto de 2008 a Luz Helena Villamil Jiménez y/o Mónica Vargas Vargas, por la sociedad **ImClone Systems Incorporated**, con domicilio en 180 Varick Street, New York, New York 10014, Estados Unidos de América. El poder fue otorgado a dos columnas inglés / español en texto idéntico, y por ello no se traduce.

En la página 3 del documento se encuentra una certificación notarial sobre la presentación personal y reconocimiento de firma de Gregory Mayes, quien obrando en calidad de Vicepresidente del Consejo General de **ImClone Systems Incorporated** firmó el Poder que antecede. Se certifica además que esta sociedad se encuentra constituida bajo las leyes del Estado de Delaware, y que su domicilio es 180 Varick Street, New York, New York 10014, Estados Unidos de América. Esta certificación ha sido expedida en texto idéntico a dos columnas inglés / español y se encuentra firmada por Angela Sacca como Notario Público, tal como consta en la legalización de la apostilla anteriormente traducida. Esta certificación notarial fue expedida el día 11 de Agosto de 2008, y en la parte inferior izquierda, junto con el sello seco de Angela Sacca, lleva un sello en tinta negra, que se traduce a continuación.

ANGELA SACCA
NOTARIO PUBLICO
ESTADO DE NEW JERSEY
Mi Comisión Expira el 24 de Julio de 2012

FIN DE LA TRADUCCIÓN

Es traducción fiel y completa de los textos en inglés del documento en referencia.

Luz Helena Villamil Jiménez
 Luz Helena Villamil Jiménez

Resolución No. 0754 de 18 de mayo de 2004
 Ministerio del Interior y de Justicia

HELENA VILLAMIL J.
 ADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
 RES. NO. 0754 - MAYO 18/2004
 MIN. DEL INTERIOR Y DE JUSTICIA

Luz Helena Villamil Jiménez



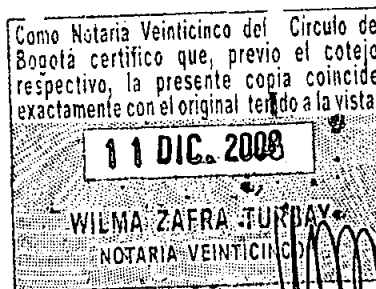
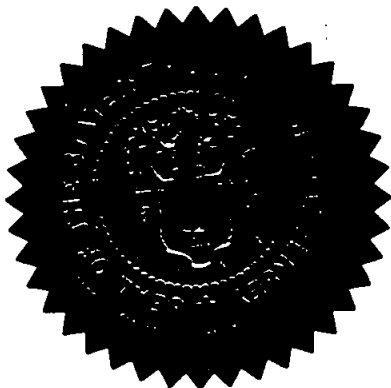
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
ANGELA SACCA
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
ANGELA SACCA, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 14TH DAY OF AUGUST 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A336749
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



VILLAMIL - IP LEGAL SERVICES

CALLE 93-A NO. 14-17 OFICINA 609

BOGOTA, COLOMBIA

POWER OF ATTORNEY (COMPANIES)

The undersigned (La suscrita),

..... ImClone Systems Incorporated

located at (con domicilio en)

..... 180 Varick Street, New York, New York 10014, US

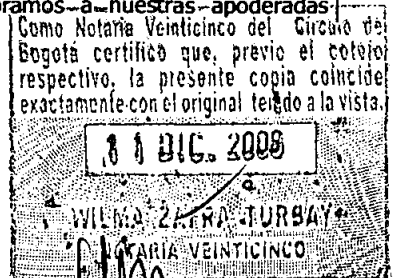
PODER (SOCIEDADES)

hereby appoint **LUZ HELENA VILLAMIL-JIMENEZ** and/or **MONICA VARGAS-VARGAS** of the law firm **VILLAMIL - IP LEGAL SERVICES** as our attorneys in Colombia with a special, ample and sufficient Power to carry before the corresponding national offices and authorities, whether administrative or judicial, in any instance, stage or recourse, the necessary proceedings to obtain patents, utility models and industrial designs, registration of layout-designs of integrated circuits trademark registrations, commercial slogans, renewals, recordal of assignments, mergers, changes of name or domicile of owner, licenses of use, filing and prosecution of oppositions, deposit of commercial names or ensigns and any other industrial property rights; sanitary registrations before the Health Authorities; copyright registrations before the Copyright Office; registration of domain names before the Colombian NIC and registration of plant varieties before the ICA. The attorneys are hereby empowered to act in our behalf in any instance or before any court, corporation, public officer or authority in judicial, administrative, contentious administrative or police actions; in prescription or nullity proceedings; actions derived from the obtainment or exploitation of licenses; unfair competition actions; criminal actions; actions for indemnification, damages, claims and precautionary measures, or whatever similar or equivalent actions. To this end, the attorneys are empowered to take before the mentioned authorities and/or officials all the necessary steps for the indicated purposes: To file applications, lawsuits, claims, statements, formulate descriptions, protests, recourses, claims, pay taxes and installments and make all other payments determined by law; request depositions, receive documents and values; to settle, transact, submit to arbitration, withdraw, waive, renounce and receive. The attorneys are granted sufficient Power to receive service of notice on our behalf, grant powers to represent the company in or out of court, respond any claims or actions against us and do whatever deemed necessary or convenient before the administrative or Judicial authorities for the protection of our intellectual property in Colombia, granting them also power to substitute this proxy and if necessary, to revoke such substitutions.

For purposes of articles 597 and 543 of the Colombian Code of Commerce we appoint the above named

por el presente nombramos a las doctoras **LUZ HELENA VILLAMIL JIMENEZ** y/o **MONICA VARGAS-VARGAS** de la firma **VILLAMIL - IP LEGAL SERVICES** como nuestras apoderadas en Colombia con poder especial amplio y suficiente para actuar ante las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales o de policía, en cualquier instancia, etapa o recurso, en todo tipo de procedimientos relativos a propiedad intelectual, propiedad industrial y derecho sanitario relativos a: Patentes, modelos de utilidad, diseños industriales y esquemas de trazado de circuitos integrales; registro de marcas, lemas comerciales, renovaciones, anotación de traspasos, fusiones, cambios de nombre, cambios de domicilio, licencias de uso y demás derechos de propiedad industrial; presentación y trámite de oposiciones, depósito de nombres y enseñas comerciales; registros sanitarios ante las autoridades de salud, y registros ante la Oficina de Derecho de Autor; registros de nombres de dominio ante el NIC Colombiano, registros de productos ante el ICA y registros de variedades vegetales ante el ICA. Las apoderadas quedan además facultadas para intervenir en nuestra representación como demandantes o como demandados en cualquier instancia y ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas, contencioso administrativas o de policía, en acciones de caducidad o de nulidad; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales; acciones de indemnización, de perjuicios, de reclamo y medidas cautelares y cualesquiera otras acciones o medidas similares o equivalentes. A este efecto las apoderadas quedan facultadas para dar ante las mencionadas autoridades y/o funcionarios todos los pasos necesarios al objeto indicado: Elevar solicitudes y demandas, formular descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, pagar impuestos, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede a las mandatarias poder bastante para recibir notificaciones a nuestro nombre, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial o extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que pudieren presentarse en contra nuestra, y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier orden para la protección de nuestra propiedad intelectual e industrial en Colombia, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Para los propósitos de los artículos 597 y 543 del Código de Comercio Colombiano, nombramos a nuestras apoderadas



NOTARIAL CERTIFICATE

CERTIFICACION NOTARIAL

The undersigned Notary Public certifies that Gregory Mayes appeared before me and signed the preceding document; that I know him personally and I am certain that he has legal capacity to grant it; that he is Vice President, Interim General Counsel of ImClone Systems Incorporated, and is consequently authorized to grant such document; that such company is organized under de laws of the State of Delaware, US and is domiciled in 180 Varick Street, New York, New York 10014, US; and that the act for which this document is granted is included among those which constitute the corporate object of the named company. Furthermore, that such company performs its corporate purposes in accordance with the laws of its incorporation and domicile.

I am certain of all these facts because I have examined the corresponding documents consisting of the Certificate of Incorporation dated 26 April 1984 / Resolution of the Board of Directors dated 2 August 2007/ Annual Report (form 10-K) filed with US Securities and Exchange Commission dated 29 February 2008/ Report of Unscheduled Material Events or Corporate Changes (form 8-K) filed with US Securities and Exchange Commission dated 11 January 2008, of which I hereby attest.

Angela Sacca
NOTARY PUBLIC (Signature)

Issued and signed in Branchburg, NJ

Date August 11, 2008

ANGELA SACCA
NOTARY PUBLIC
STATE OF NEW JERSEY

El suscrito Notario Público certifica que Gregory Mayes compareció ante mí y firmó el documento que antecede, que lo/la conozco personalmente, y que me consta que tiene capacidad legal para otorgarlo; que él/ella es Presidente, Asesor legal de ImClone Systems Incorporated, y consecuentemente está autorizado(da) para otorgar dicho documento; que dicha sociedad se encuentra constituida bajo las leyes del Estado de Delaware, USA y se encuentra domiciliada en 180 Varick Street, New York, New York 10014, Estados Unidos y que el acto para el cual este documento se otorga se encuentra comprendido entre los que constituyen el objeto social de la mencionada sociedad. Adicionalmente, que dicha sociedad desarrolla su objeto social de acuerdo con la ley de su incorporación y domicilio.

Los anteriores hechos me constan porque he examinado los documentos correspondientes, consistentes en los Estatutos de fecha Abril 26, 1984 ~~los~~ ~~Artículos de Incorporación de~~ ~~fecha~~ / la Resolución de la Junta Directiva de fecha Agosto 2, 2007*, de lo cual doy fe.

(Firmado)

NOTARIO PUBLICO (firma)
Expedido y firmado en
Fecha

* Reporte Anual (Forma 10-K) presentado a la Comisión de Valores y Cambio de los Estados Unidos el 29 de febrero de 2009, y el Reporte de Eventos materiales no programados de fecha 11 de enero de 2008.

Como Notaria Veinticinco del Circuito de Bogotá certifico que, previo el cotejo respectivo, la presente copia coincide exactamente con el original leído a la vista.
11 DIC. 2008
WILMA ZAFRA-TREJOS
NOTARIA VEINTICINCO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 95,383
FECHA : DICIEMBRE 10 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-133771- -00000-0000

Fecha: 2008-12-17 11:42:25 Dep. 2020 NUECREACION
Ira. 11 PATENTE IYH Eve: 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 61

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LUZ HELENA VILLAMIL JIMEN	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	9268174	09/12/2008	1,002,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCIÓN

PCT

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: DICIEMBRE 17, 2008

(51) Clasificación Internacional:

A61K 39/396

(71) Solicitante(s)

IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED

(72) Inventor(es)

KOWINSKY, ERIC

(74) Agente:

JURHELENA VILLAMIL S.

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

(32) Fecha

(33) País

60/833,487 Jul. 27, 2006 USA

(85) Fecha inicio fase nacional: DIC. 17, 2008

(86) Datos relativos a la presentación de la solici. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 26 JUN 2009

No. de solicitud PCT/US 2009/074448

(87) Publicación internacional:

Fecha: ENERO 31, 2008

No. Publicación: WO/2008/014386

(54) Título: TRATAMIENTO DE TUMORES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

(57) Resumen:

Resumen: Los métodos de terapia de combinación para tratar tumores pediátricos mediante la administración de un antagonista del EGFR y un agente quimioterapéutico son descritos. Los métodos incluyen también tratar tumores pediátricos refractarios.

FIGURA CARACTERISTICA

6 x 6 cm

CONTINUA AL RESPALDO ...

ERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

PATENTE



MODELO DE UTILIDAD



DISEÑO INDUSTRIAL



SOLICITANTES, RAZON SOCIAL, O APELLIDOS Y NOMBRES

INCULCONE SYSTEMS INCORPORATED

DOMICILIO

180 VARICK STREET, NEW YORK, N.Y. 10014

APODERADO

HELENA VILLAMIL JIMENEZ

TITULO

TRATAMIENTO DE TUMORES EN PACIENTES PEDIATRICOS CON ANTAGONISTAS

CLASIFICACION

A 61K 39/305

EXPEDIENTE No.

FECHA DE SOLICITUD

ROLLO MICROFILM

CERTIFICADO No.

FECHA DE CONCESION

VIGENCIA DESDE

HASTA

PRORROGA

CAMBIO DE NOMBRE

TRASPASO A

INVENTOR (ES)

OTROS

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Buró Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
31 de Enero de 2008 (31.01.2008)

TCP

(10) Número de publicación Internacional
WO 2008/014386 A2

(51) Clasificación Internacional de Patente:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional:
PCT/US2007/074448

(22) Fecha de Presentación Internacional:
26 de Julio de 2007 (26.07.2007)

(25) Idioma de presentación: Inglés

(26) Idioma de publicación: Inglés

(30) Fecha de prioridad:
60/833,487 27 de Julio 2006 (27.07.2006) US

(71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto US): **IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED**
[US/US]; 180 Varick Street, New York, NY 10014 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para EU solamente): **ROWINSKY, Eric** [US/US]; 5 Robin Road, Warren, NJ 07059 (US)

(74) Agente: **MERCANTI, Michael N.**; Lucas & Mercanti, LLP 475 Park Avenue South, New York, NY 10016 (US).

(81) Estados designados: (a menos que se indique otra cosa para cada clase de protección nacional disponible): AE,

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

(84) Estados Designados: (a menos que se indique otra cosa para cada clase de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Publicada:

— Sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicada una vez que se reciba dicho reporte.

— Con listas de secuencia como parte de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible sobre el pedido de la Oficina Internacional.

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, referirse a "Guidance. Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada volumen regular de la Gaceta TCP.

(54) Título: **TRATAMIENTO DE TUMORES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO**

(57) Resumen: Los métodos de terapia de combinación para tratar tumores pediátricos mediante la administración de un antagonista del EGFR y un agente quimioterapéutico son descritos. Los métodos incluyen también tratar tumores pediátricos refractarios

WO 2008/014386 A2

TRATAMIENTO DE TUMORES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO

Referencia Cruzada a las Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de E.U.A. No. de Serie 60/833,487, presentada el 27 de Julio de 2006, los contenidos de la cual están aquí incorporados en su totalidad mediante referencia.

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a tratar tumores en pacientes pediátricos mediante administrar una combinación de un antagonista del EGFR y un agente quimioterapéutico.

Antecedentes de la Invención

En los Estados Unidos, 11,900 niños y adolescentes menores de 20 años fueron diagnosticados con cáncer en el 2001 y aproximadamente 2,200 murieron de este padecimiento. Los tumores sólidos suman aproximadamente 30% de los casos de cánceres en niños. Los cánceres del sistema nervioso y el cerebro invasivos suman el 17% de todos los cánceres pediátricos, seguidos solamente por la leucemia linfocítica. Aproximadamente la mitad de los casos diagnosticados de los tumores cerebrales son malignos. Otros

cánceres comunes en la infancia incluyen sarcoma de Erwing, leucemia, neuroblastoma, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de tejido suave, y tumores de Wilms.

Uno de los mayores obstáculos en el tratamiento de los tumores cerebrales en niños es que el cerebro aún está atravesando un desarrollo rápido y es vulnerable a las toxicidades de los tratamientos tales como la radiación o quimioterapia. Los obstáculos también aparecen en el tratamiento de otros tipos de cánceres de la infancia. Por consiguiente, son necesarias nuevas terapias para tratar tumores en pacientes pediátricos.

La familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está expresada y sobre expresada en varios cánceres y generalmente está involucrada en tumorigénesis. La familia del EGFR incluye el receptor de EGF (el EGFR, también conocido como erbB-1/HER1), HER2 (también conocido como cneu/erbB-2), erbB-3/HER3, y erbB-4/HER4. Por ejemplo el EGFR y HER2 han jugado un papel crítico en procesos que regulan crecimiento celular de tumor y sobrevivencia. En particular, el EGFR ha estado implicado en varias rutas que afectan la sobrevivencia y la protección a partir de la apoptosis, diferenciación y metástasis (incluyendo migración celular e invasión). Entre esos cánceres que expresan EGFR algunos de los más prevalentes incluyen: cabeza y cuello, colorectal, pancreático, ovárico, de célula renal, de pulmón de célula no pequeña y gliomas. La pronosis para varios de estos cánceres es pobre si no se diagnostica en un estado

temprano, y la terapia para un padecimiento avanzado es limitada.

Comúnmente hay varios inhibidores de EGFR en pruebas clínicas para el tratamiento de algunos de estos cánceres. Uno de dichos ejemplos es ERBITUX® (cetuximab) (elaborado por ImClone Systems Inc.) que es un anticuerpo monoclonal quimérico (humano/ratón) que bloquea el ligando que se enlaza al EGFR, previene la activación del receptor, e inhibe el crecimiento de células en cultivo. Otro ejemplo es ABX-EGF, que es un anticuerpo monoclonal completamente humano específico para EGFR que según se informa bloquea el enlace del factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), dos ligandos que son conocidos para enlazar a EGFR. El HERCEPTIN® (trastuzumab) es un anticuerpo humanizado probado para el tratamiento de cáncer de pecho metastático positivo HER2, que es designado como blanco y bloquea la función de sobre expresión de la proteína HER2.

En suma, las pruebas clínicas han comúnmente esta conducidas en varios inhibidores del EGFR de molécula pequeña. Un ejemplo de inhibidor de tirosina cinasa es IRESSA™, que es un inhibidor de tirosina cinasa del EGFR de molécula pequeña que según se informa inhibe la actividad de tirosina cinasa del EGFR es citostático hacia un rango de células de cáncer humanas que expresan EGFR funcional, y puede inhibir la proliferación de células de tumor a través de sobre regulación de p27.

Resumen de la Invención

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor en pacientes pediátricos mediante tratar al paciente pediátrico con una cantidad efectiva de un antagonista de EGFR y un agente quimioterapéutico. En una modalidad preferida, el antagonista del EGFR es un anticuerpo EGFR que específicamente enlaza al dominio extracelular del EGFR y activación neutralizada del mismo. En una modalidad preferida, el agente quimioterapéutico es irinotecan.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona métodos para tratar tumores en pacientes pediátricos mediante administrar una cantidad efectiva de un antagonista del EGFR y un agente quimioterapéutico. De acuerdo con la presente invención, los pacientes pediátricos son pacientes desde el nacimiento hasta los 18 años de edad. El tratamiento incluye: (1) prevenir que ocurra el padecimiento en un paciente que puede estar predispuesto al padecimiento pero que no ha aún experimentado o mostrado los síntomas del padecimiento; e.j., prevención de la aparición de los síntomas clínicos; (2) inhibir el crecimiento del tumor, e.j., detener su desarrollo; o (3) aliviar el tumor, e.j., causar la regresión de los síntomas del tumor. Inhibir el crecimiento del tumor que incluye hacer más lento o detener el crecimiento, así como también causar la regresión del tumor. Una cantidad efectiva para el

tratamiento de un padecimiento significa aquella cantidad que cuando es administrada a un paciente que la necesita, es suficiente para efectuar el tratamiento del padecimiento, como es definido anteriormente.

Los tumores que son tratados de acuerdo con la presente invención son cualquiera de los tumores que expresan EGFR. Tales tumores incluyen blastomas, incluyendo hepatoblastomas y neuroblastomas; carcinomas, incluyendo adenocarcinomas; gliomas, incluyendo ependimomas, astricitomas, oligodendrogliomas y gliomas mezclados; sarcomas, incluyendo rhabdomyosarcomas y adenosarcomas, y adenomas. Los tumores pueden ocurrir virtualmente en todas las partes del cuerpo, incluyendo, por ejemplo, el pecho, corazón, pulmón, esófago, intestino delgado, colon, recto, estómago, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, laringe, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula espinal, sangre, timo, útero, testículos, cérvix, o hígado. En una modalidad preferida los tumores son tumores del sistema nervioso tales como gliomas y neuroblastomas. Los tumores a ser tratados incluyen tumores primarios y metásticos, así como también tumores refractarios. Los tumores refractarios incluyen tumores que fallan a la respuesta o que son resistentes al tratamiento con agentes quimioterapéuticos solos, anticuerpos solos, radiación sola, o combinaciones de los mismos. Los tumores refractarios también abarcan tumores que aparentan ser inhibidos con el tratamiento con dichos agentes, pero que reaparecen a los cinco años, algunas veces

hasta los diez años o más, después de que el tratamiento es discontinuado.

Un antagonista del EGFR, de acuerdo con la presente invención puede ser un antagonista extracelular o un antagonista intracelular y puede ser empleado más de un antagonista. Los antagonista extracelulares incluyen, pero no están limitados a, proteínas u otras moléculas biológicas que enlazan al EGFR. En algunas modalidades de la invención, un antagonista extracelular enlaza al dominio extracelular del EGFR e inhibe el enlace del EGFR a uno o más de sus ligandos y/o neutraliza la activación inducida de ligando de EGFR. Los ligandos del EGFR incluyen EGF, TGF- α , anfiregulina, EGFR enlazando heparina (HB-EGF y betacelulina. Los antagonistas del EGFR extracelular pueden también incluir sustancias que inhiben la dimerización del EGFR con otras subunidades del receptor del EGFR (i.e., homodímeros de EGFR) o heterodimerización con otros receptores del factor de crecimiento (e.j. HER2)

En una modalidad preferida, el antagonista del EGFR es un anticuerpo que enlaza al EGFR y bloquea el enlace del ligando. Un ejemplo de un anticuerpo EGFR es cetuximab (IMC-C225) (No. de acceso del Banco de Genes No. INQLA), que es un anticuerpo monoclonal IgG quimérico (humano/ratón). Ver e.j., la Patente de E.U. No. 4,943,533 (Mendelson et al.); No de Patente de Estados Unidos 6,217,866 (Schlessinger et al.); Nos de Solicitud de Estados Unidos 08/973,065 (Goldstein et al.) y 09/635,974 (Teufel); WO 99/60023

(Waksal et al.) y WO 00/69459, de los cuales todos están aquí incorporados mediante referencia. El cetuximab específicamente enlaza al EGFR y bloquea el enlace de un ligando tal como EGF. El Fab del cetuximab contiene el fragmento Fab del Cetuximab, i.e., las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada del anticuerpo murino M225 (No. de Serie de la Solicitud de los Estados Unidos 2004/0006212, incorporada aquí mediante referencia) con la IgG1 C_H1 humana y dominios constantes de cadena ligera kappa (el cetuximab incluye todos los tres dominios constantes de cadena pesada de la IgG1). Las regiones CDR de la cadena pesada del cetuximab tienen las siguientes secuencias: una región CDR1 con una secuencia de N Y G V H (SEQ ID NO:1), una región CDR2 con una secuencia de V I W S G G N T D Y N T P F T S (SEQ ID NO. 2), y una región CDR3 con una secuencia de A L T Y Y D Y E F A Y (SEQ ID NO.3). Las regiones CDR de la cadena ligera del cetuximab tienen las siguientes secuencias: una región CDR1 con una secuencia de R A S Q S I G T N I H (SEQ ID NO. 4), una región CDR2 con una secuencia de Y A S E S I S (SEQ ID NO. 5), y una región CDR3 con una secuencia de Q Q N N N W P T T (SEQ ID NO.6).

Otro ejemplo de un anticuerpo EGFR es ABX-EGF, que es un anticuerpo monoclonal de IgG2 completamente humano específico para EGFR. El ABX-EGF enlaza EGFR con alta especificidad, bloqueando el enlace de EGFR a ambos de sus ligandos, EGF y TGF- α . Ver por e.j. Figlin et al., Resumen 1102 presentado en la Reunión Anual 37a de

ASCO, San Francisco, CA, del 12 al 15 de Mayo del 2001, el cual está aquí incorporado mediante referencia. La secuencia y la caracterización del ABX-EGF- que fue anteriormente conocido como clon E7.6.3, están descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 6,235,883 (Abgenix, Inc) en la col. 28, línea 62 hasta la columna 29, línea 36 y en las Figuras 29 a 34, la cuál está aquí incorporada mediante referencia. (Ver también Yang et al., *Critical Rev. Oncol./Hematol.*, 38(1):17-23,2001, que está aquí incorporada mediante referencia).

Otro ejemplo de un anticuerpo EGFR es HERCEPTIN® (trastuzumab), que es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de AND recombinante que enlaza selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en célula (Kd de 5nM) al dominio extracelular de la proteína del EGFR2 humana, HER2. El anticuerpo es una IgG₁ kappa que contiene regiones variables con las regiones que determinan complementaridad de un anticuerpo murino (4D5) que enlaza al HER2. Ver por e.j., la Publicación de Patente Internacional No. WO 01/89566 (Mass), que es aquí incorporada mediante referencia.

Otros anticuerpos EGFR incluyen EMD 72000 (Merck KGaA), que son una versión humanizada del anticuerpo monoclonal anti-EGFR murino EMD 55900; h-R3 (Thera CIM), que es un anticuerpo monoclonal anti-EGF humanizado; Y10, que es un anticuerpo monoclonal murino y que fue desarrollado contra un homólogo murino de la mutación EGFRvIII humano; y MDX-447 (Maderex). Ver las

Patentes de Estados Unidos Números 5,558,864 (Bending et al.), 5, 884,093 (Kettleborough et al.), y 5,891,996 (Mateo de Acosta del Río et al.), todas ellas se encuentran aquí incorporadas mediante referencia.

Los antagonistas del EGFR intracelulares pueden ser moléculas biológicas, pero son usualmente moléculas pequeñas, tales como inhibidores sintéticos de cinasa que actúan directamente en el dominio citoplásmico del EGFR para inhibir la transducción de señal mediadas por el EGFR. Un ejemplo de un antagonista del EGFR de molécula pequeña es IRESSATM (ZD1939), que es un derivado de quinozalina que funciona como un ATP-mimético para inhibir EGFR. Ver Patente de Estados Unidos Nú. 5,616,582 (Zeneca Limited); WO 96/33980 (Zeneca Limited) en la Pág. 4; ver también, Rowinsky et al., Resumen 5 presentado en la Reunión Anual 37a de ASCO, San Francisco, CA, del 12 al 15 de Mayo del 2001; Anido et al., Resumen 1712 presentado en la Reunión Anual 37a de ASCO, San Francisco, CA, del 12 al 15 de Mayo del 2001. Otros ejemplos de un antagonista del EGFR de molécula pequeña es TARCEVA® (OSI-774), que es un inhibidor de EGFR derivado de 4-(fenilamino sustituido)quinozalina hidrocloreuro de [6,7-Bis(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)amina. Ver WO 96/30347 (Pfizer Inc.) en, por ejemplo, la pag. 2, línea 12 hasta la página 4, línea 34 y la página 19 líneas 14 a 17. Ver también Moyer et al., *Cancer Res*, 57:4838-48 (1997); Pollack et al., *J. Pharmacol.*, 291: 739-48 (1999). El TARCEVA® puede funcionar mediante la inhibición

de fosforilación del EGFR y bajar su corriente P13/Akt y sus caminos de transducción de señal de cinasa MAP (proteína activada mitogen) que resultan en la detención del ciclo celular mediado por p27. Ver Hidalgo et al., Resumen 281 presentado en la Reunión Anual 37a de ASCO, San Francisco, CA, del 12 al 15 de Mayo del 2001.

Otras moléculas pequeñas son también reportadas para inhibir el EGFR, varias de las cuales son específicas para el dominio de tirosina cinasa de un EGFR. Algunos ejemplos de dichos antagonistas del EGFR de molécula pequeña están descritos en WO 91/116051, WO 96/30347, WO 96/33980, WO 97/27199 (Zeneca Limited). WO 97/30034 (Zeneca Limited), WO 97/42187 (Zeneca Limited), WO 97/49688 (Pfizer Inc.), WO 98/33798 (Warner Lambert Company), WO 00/18761 (American Cyanamid Company), y WO 00/31048 (Warner Lambert Company). Ejemplos de antagonistas del EGFR de molécula pequeña incluyen C1-1033 (Pfizer), que es un inhibidor de quinozalin (N-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinazolin-6-il]-acrilamida) de tirosinas cinasas, particularmente el EGFR está descrito en WO 00/31048 en la página 8, líneas 22-6; PK1166 (Novartis), el cual es un inhibidor de pirrolopirimidina del EGFR y está descrito en WO 97/27199 en las páginas 10-12; GW2016 (GlaxoSmithKline), que es un inhibidor del EGFR y HER2; EKB569 (Wyeth), que está reportado para inhibir el crecimiento de células de tumor que sobreexpresan el EGFR o HER2 *in vitro* e *in vivo*; AG-1478 (Tryphostin), que es una molécula pequeña de quinazolina que inhibe la señalización de tanto el

EGFR y erbB-2; AG-1478 (Sugen), que es un inhibidor bisubstrato que también inhibe proteína cinasa CK2; PD 153035 (Parke-Davis) que se reporta inhibe la actividad de cinasa del EGFR y crecimiento de tumor, induce apoptosis en células en cultivo, e intensifica la citotoxicidad de agentes quimioterapéuticos citotóxicos; SPM-924 (Schwarz Pharma), que es un inhibidor de tirosina cinasa señalado para tratamiento de cáncer de próstata; CP-546,989 (OSI Pharmaceuticals) que se reporta inhibe angiogénesis para tratamiento de tumores sólidos; ADL-681, que es un inhibidor de cinasa del EGFR señalado para tratamiento de cáncer, PD 158780, que es piridopirimidina que se reporta inhibe el grado de crecimiento de tumor de xenógrafos A4431 en ratones; CP-358,774, que es una quinazolina que se reporta inhibe autofosforilación en xenógrafos HN5 en ratones; ZD1839, que es una quinazolina que se reporta tiene actividad anti-tumor en modelos de xenógrafo de ratón incluyendo cánceres de vulva, NSCLC, próstata, ovario y colorectal; CGP 59326A, que es una pirrolopirimidina que se reporta inhibe el crecimiento de xenógrafos EGFR positivos en ratones; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 y CGP53353 (Novartis), que son dianilnoftalimidas. Los inhibidores de tirosina cinasa del EGFR derivados naturalmente incluyen genisteína, herbimicina A, quercetina y erbstatina.

Las moléculas pequeñas adicionales reportadas para inhibir el EGFR, y que están de este modo dentro del campo de la presente invención, son compuestos tricíclicos tales como los compuestos

descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5,679,683; derivados de quinazolina tales como los derivados descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,616,582; y compuestos indolo tales como los compuestos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5,196,446.

Se aprecia que las moléculas pequeñas útiles a ser usadas en la invención son inhibidores de EGFR, pero no necesitan ser completamente específicas para EGFR.

En una modalidad preferida, el antagonista del EGFR es un anticuerpo anti-EGFR que exhibe una o más de las siguientes propiedades:

- 1) El anticuerpo enlaza al dominio externo del EGFR e inhibe enlace de ligando. La inhibición puede ser determinada por ejemplo mediante una prueba de enlace directo utilizando receptor enlazado a membrana o purificado. En esta modalidad, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos, de preferencia enlazan EGFR al menos tan fuertemente como lo hacen los ligandos naturales el EGFR (EGF, TFG- α).

- 2) Los anticuerpos neutralizan el EGFR. El enlace de un ligando a un dominio extracelular externo del EGFR estimula la actividad de la tirosina cinasa y la fosforilación del receptor y/o la fosforilación de otras proteínas involucradas en los diferentes modos de señalización. La neutralización del EGFR incluye inhibición, disminución, inactivación y/o interrupción de una o más de las actividades

normalmente asociadas con la transducción de señal. La neutralización puede estar determinada *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* utilizando por ejemplo tejidos, células cultivadas, o componentes celulares purificados.

Una medida de la neutralización del EGFR es la inhibición de la actividad del receptor tirosina cinasa. La inhibición de la tirosina cinasa puede estar determinada utilizando métodos bien conocidos; por ejemplo mediante medir el nivel de autofosforilación del receptor de la cinasa recombinante, y/o la fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. De esta manera, en el contexto de la presente invención las pruebas de fosforilación son útiles para determinar la neutralización de anticuerpos. La fosforilación puede ser detectada por ejemplo utilizando un anticuerpo específico para fosfotirosina en una prueba de ELISA o en un western blot. Algunas pruebas para la actividad de la tirosina cinasa son descritas en Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 1433-44 (1997) y Batley et al., *Life Sci* 62:143-50 (1998). Los anticuerpos de la invención provocan una disminución en la fosforilación de la tirosina del EGFR de al menos 75%, de preferencia de al menos 85% y con mayor preferencia de al menos 90% en células que responden al ligando.

Otra medida de la neutralización del EGFR es la inhibición de la fosforilación de sustratos de corriente abajo del EGFR. Por consiguiente, el nivel de fosforilación del MEK y ERK puede ser medido. La disminución en la fosforilación es de al menos

aproximadamente 40% y puede ser al menos de aproximadamente 60% o al menos de aproximadamente 80%.

En suma, los métodos para detección de expresión de proteína pueden ser utilizados para determinar la neutralización del EGFR, en donde las proteínas que son medidas están reguladas por la actividad de la tirosina cinasa del EGFR. Estos métodos incluyen inmunohistoquímica (IHC) para detección de la expresión de proteína, hibridación in situ fluorescente (FISH) para detección de amplificación de genes, pruebas de enlace de radioligando competitivo, técnicas de separación de matriz sólida, tales como Northern y Southern Blot, reacción de cadena de polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR) y ELISA. Ver, e.g. Grandis et al., *Cancer* 78:1284-92 (1996); Shimizu et al., *Japan J. Cancer Res.*, 85:567-71 (1994); Sauter et al., *Am J. Path.*, 148:1047-53 (1996); Collins, *Glia* 15:289-96 (1995); Radinsky et al., *Clin. Cancer Res.* 1:19-31 (1995); Petrides et al., *Cancer Res* 50:3934-39 (1990); Hoffmann et al., *Anticancer Res* 17:4419-26 (1997); Wikstrand et al., *Cancer Res.* 55:3140-48 (1995).

Las pruebas *ex vivo* también pueden ser utilizadas para determinar la neutralización del EGFR. Por ejemplo, la inhibición del receptor tirosina cinasa puede ser observado mediante pruebas mitogénicas utilizando líneas de células estimuladas con el ligando del receptor en la presencia y ausencia de inhibidor. Un ejemplo de tal prueba mitogénica son células de prueba mitogénica de células (3T3 (clon A31-714)) de la Colección de Cultivos de Tipo Americano (Manassas,

VA)). Otro método involucra probar para inhibición de crecimiento de células de tumor que expresan EGFR transfectadas para expresar EGFR. La inhibición puede también ser observada utilizando modelos de tumor, por ejemplo, células de tumor humano inyectadas en un ratón.

Los anticuerpos de la presente invención no están limitados a ningún mecanismo en particular de neutralización del EGFR. Los anticuerpos anti-EGFR de la presente invención pueden enlazar externamente al receptor de superficie de células del EGFR, bloquear el enlace del ligando y la transducción de señal subsiguiente mediada a través del receptor asociado con tirosina cinasa; y prevenir la fosforilación del EGFR y otras proteínas corriente abajo en la cascada de transducción de señal.

3) Los anticuerpos inferiores modulan el EGFR. La cantidad del EGFR presente en la superficie de una célula depende de la producción de proteína del receptor, la internalización y degradación. La cantidad del EGFR presente en la superficie de una célula puede ser medida indirectamente, mediante detectar la internalización del receptor o una molécula enlazada al receptor. Por ejemplo, la internalización del receptor puede ser medida mediante contactar células que expresan el EGFR con un anticuerpo etiquetado. El anticuerpo enlazado a membrana es luego descubierto, recolectado y contado. El anticuerpo internalizado es determinado mediante lisar las células y detectar etiquetas en los lisatos.

Otra manera es medir directamente la cantidad del receptor presente en la célula siguiendo el tratamiento con un anticuerpo anti-EGFR u otra sustancia, por ejemplo, mediante análisis al azar de células activadas fluorescente de células teñidas para expresión de superficie de EGFR. Las células teñidas son incubadas a 37°C y la intensidad de la fluorescencia medida durante el tiempo. Como un control, parte de la población teñida puede ser incubada a 4°C (condiciones bajo las cuales la internalización del receptor es detenida).

Otra medida de modulación inferior es la reducción de la proteína total del receptor presente en una célula, y reflejar degradación de receptores internos. Por consiguiente, el tratamiento de células (particularmente células de cáncer) con anticuerpos de la invención resulta en una reducción en el EGFR total celular. En una modalidad preferida, la reducción es de al menos 70%, con mayor preferencia de al menos 80% y aún con mayor preferencia de al menos 90%.

Para el tratamiento de sujetos humanos, los anticuerpos de acuerdo con la invención son de preferencia humanos. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser de primates no humanos u otros mamíferos, o ser anticuerpos humanizados o quiméricos.

Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la invención pueden ser producidos mediante partir un anticuerpo completo, o mediante expresar el ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de los anticuerpos pueden ser preparados mediante métodos descritos

por Lamoy et al., *J. Immunol. Methods*, 56: 253-243 (1983) y por Parham, *J. Immunol.* 131: 2895-2902 (1983). Tales fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F8ab')². Tales fragmentos pueden también contener anticuerpos de región variable de fragmento de cadena sencilla, i.e. scFv, diacuerpos, u otros fragmentos de anticuerpo. Los métodos para producir tales equivalentes funcionales están descritos en la Solicitud PCT WO 93/21319, la Solicitud de Patente Europea No. EP 239400; la Solicitud PCT WO 89/09622; la Solicitud de Patente Europea EP 338745; y la Solicitud de Patente Europea EP 332424.

Las células hospederas preferidas para transformación de vectores y expresión de anticuerpos de la presente invención son células de mamífero, e.j., células COS-7, células de ovario de hamster chino (CHO), y líneas de célula de origen linfoide tales como linfoma, mieloma (e.j. NS0), o células hibridoma. Otras hospederos eucarióticos, tales como levaduras, pueden ser alternativamente utilizadas.

Las células hospederas transformadas y cultivadas mediante métodos conocidos en el arte en un medio líquido que contienen fuentes asimilables de carbono (carbohidratos tales como glucosa o lactosa), nitrógeno (aminoácidos, péptidos, proteínas o sus productos de degradación tales como peptones, sales de amonio o similares), y sales inorgánicas. El medio además contiene, por ejemplo, sustancias que promueven el crecimiento, tales como elementos traza, por

ejemplo, hierro, zinc, manganeso y similares.

Los anticuerpos anti-EGFR de alta afinidad de acuerdo con la presente invención pueden ser aislados a partir de una librería mostrada de fago construida a partir de genes humanos de región variable de cadena ligera y pesada. Por ejemplo, un dominio variable de la invención puede ser obtenido a partir de un linfocito de sangre periférica que contiene un gen de región variable arreglado. Alternativamente, las porciones del dominio variable, tales como regiones CDR y FW, pueden ser obtenidas a partir de diferentes fuentes y recombinadas. Adicionalmente, las porciones de los dominios variables (e.j., regiones FW) pueden ser secuencias de consenso sintéticas.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención pueden ser obtenidos, por ejemplo, a partir de anticuerpos ocurridos naturalmente, o librerías expuestas de Fab o scFv. Está entendido que para hacer un anticuerpo de dominio individual a partir de un anticuerpo que comprende un dominio V_H y V_L , pueden ser deseadas ciertas sustituciones de aminoácido fuera de los CDRs para intensificar enlace, expresión o solubilidad. Por ejemplo, puede ser deseado para modificar residuos de aminoácido que pudieron de otra manera ser quemados en la interface V_H - V_L .

Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden ser obtenidos mediante tecnología hibridoma estándar (Harlow & Lane, ed., *Anticuerpos: Un Manual de Laboratorio*,

30

Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que está incorporado aquí mediante referencia) utilizando ratones transgénicos (e.j., ratones KM de Medarex, San José, California) que producen cadenas ligeras kappa y pesadas gamma de inmunoglobulina humana. En una modalidad preferida, una porción sustancial del anticuerpo humano que produce el genoma es insertado en el genoma del ratón, y es deficiente al azar en la producción de anticuerpos murino endógenos. Tales ratones pueden ser inmunizados subcutáneamente (s.c.) con PDGRF α (usualmente en adyuvante de Freund completo) con estímulos según se necesite. Los métodos de inmunización son bien conocidos en el arte.

Los anticuerpos pueden ser utilizados de acuerdo con la invención incluyendo inmunoglobulinas completas, fragmentos que enlazan antígeno de inmunoglobulinas, así como también proteínas que enlazan antígeno que comprenden dominios de inmunoglobulina que enlazan antígeno. Los fragmentos de inmunoglobulina que enlazan antígeno incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', y F(ab')₂. Otros formatos de anticuerpo han sido desarrollados con especificidad de enlace retenida, pero tienen otras características que pueden ser deseables, incluyendo por ejemplo, la bioespecificidad, multivalencia (más de dos sitios de enlace) tamaño compacto (e.j. dominios de enlace solos)

Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de algunos o todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los cuales están derivados. De este modo, ellos pueden superar algunos de los

problemas asociados con la utilización de anticuerpos completos. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libres de ciertas interacciones no deseadas entre regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Adicionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener mayor permeabilidad que los anticuerpos completos, permitiendo a los anticuerpos de cadena sencilla localizar y unirse más eficientemente a los sitios de enlace de antígeno objetivo. Además, el tamaño relativamente más pequeño de los anticuerpos de cadena sencilla hace a estos menos propensos de provocar una respuesta inmune no deseada en un receptor que en los anticuerpos completos.

Los anticuerpos de cadena sencilla múltiple, cada cadena sencilla tiene un dominio V_H y un dominio V_L covalentemente unidos por un primer enlazante péptido, pueden ser unidos por al menos uno o más enlazantes péptido para formar anticuerpos de cadena sencilla, que pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos. Cada anticuerpo de cadena sencilla multivalente incluye un fragmento de cadena ligera variable y un fragmento de cadena pesada variable, y está enlazado por un enlazante péptido o al menos alguna otra cadena. El enlazante péptido está compuesto de al menos quince residuos de aminoácido. El número máximo de residuos es de aproximadamente cien.

Dos anticuerpos de cadena sencilla pueden ser combinados para formar un diacuerpo, también conocido como un dímero bivalente. Los

diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de enlace, y pueden ser monoespecíficos o bispecíficos. Cada cadena de los diacuerpos incluye un dominio V_H conectado al dominio V_L . Los dominios son conectados con enlazantes que son suficientemente cortos para prevenir emparejamiento entre dominios de la misma cadena, dirigiendo de este modo el emparejamiento entre dominios complementarios en diferentes cadenas para recrear los dos sitios de enlace de antígeno.

Estos anticuerpos de cadena sencilla pueden ser combinados para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos son contruidos con el término aminoácido de un dominio V_L o V_H fusionado directamente al término carboxilo de un dominio V_L o V_H , i.e., sin ninguna secuencia enlazante. El triacuerpo tiene tres cabezas F_v con los polipéptidos arreglados de una manera cabeza a tallo cíclica. Una conformación posible del triacuerpo es plana con los tres sitios de enlace localizados en un plano en un ángulo de 120 grados de uno y otro. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, bioespecíficos o triespecíficos.

De este modo, los anticuerpos de la invención y fragmentos de los mismos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos que ocurren naturalmente, fragmentos bivalentes tales como $(Fab')_2$, fragmentos monovalentes tales como Fab , triacuerpos de cadena sencilla, F_v (scF_v) de cadena sencilla, anticuerpos de dominio sencillos, anticuerpos de cadena sencilla multivalente, diacuerpos,

triacuerpos, y similares que se enlazan específicamente en antígenos.

De acuerdo con la presente invención, un antagonista del EGFR es administrado en una combinación con uno o más de los agentes anti-neoplásticos. Puede ser utilizado cualquier agente anti-neoplástico adecuado tal como un agente quimioterapéutico, radiación, o combinaciones de los mismos. El agente anti-neoplástico puede ser un agente alquilante o un anti-metabolito. Los ejemplos de agentes alquilante incluyen, pero no están limitados a, diplastina, ciclofosfamida, melfalan y dacarbazina. Ejemplos de anti-metabolitos incluyen, pero no están limitados a doxorubicina, daunorubicina, paclitaxel y gemcitabina.

En una modalidad preferida, el agente anti-neoplástico es un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen amifostina (etiol), cisplatina, decarbazina (DTIC), dactinomicina, meclorotmina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo (doxil), gemcitabina (gemzar), daunorubicina, daunorubicina lipo (daunoxoma), procarbizina, mitomicina, citarabina, etoposida,, tetotrexato, 5-fluoroacil, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotero), eldesleukin, asparaginasa, busulfan, carboplatin, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-camptotecin (SN38), dacarbazina, fluoxoridina, fludarabina, hiddroxiurea, ifosfamida, idarubicin, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecan,

mitoxantrona, topotecan, leuprolido, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargaso, pentostatina, pipobroman, plicamicina, estreptozocin, tamoxifen, teniposida, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucil y combinaciones de los mismos. En una modalidad más preferida, el agente quimioterapéutico es irinotecan.

Un agente anti-neoplástico, que incluye un agente quimioterapéutico y/o un anti-metabolito, es administrado en una dosis y en un horario de acuerdo con las direcciones del empaque y/o la respuesta clínica del paciente. Tales dosis son aparentes para alguien calificado en el arte y no requieren experimentación. Por ejemplo, el ironotecan es de preferencia administrado en un rango de dosis recomendada de desde aproximadamente 50 a aproximadamente 350 mg/m², si bien, la dosis puede ser más alta o más baja, dependiendo de la respuesta clínica del paciente. Otros agentes tienen rangos de dosificación de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 1,000 mg/m² por administración y/o régimen de tratamiento. El tratamiento de radiación es administrado basado en los protocolos de tratamiento clínicos apropiados y/o la experiencia clínica de alguien calificado en el arte.

En una terapia de combinación, el antagonista del EGFR es administrado antes, durante o después de que la terapia inicie con otro agente, así como también cualquier combinación de la misma, i.e., antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante

y después de de comenzar la terapia del agente anti-neoplástico. Por ejemplo, un anticuerpo EGFR puede ser administrado entre 1 y 30 días, de preferencia 3 y 20 días, con mayor preferencia entre 5 y 12 días antes de comenzar la terapia de radiación. En una modalidad preferida de la invención la quimioterapia es administrada concurrentemente con o, con mayor preferencia, subsiguiente con la terapia de anticuerpo.

En la presente invención cualquier método o ruta adecuada puede ser utilizada para administrar antagonistas de la invención, y opcionalmente para co-administrar agentes anti-neoplásticos y/o antagonistas de la invención, y antagonistas de otros receptores. Los regímenes de agente anti-neoplástico utilizados de acuerdo con la invención incluyen cualquier régimen que se considera ser adecuadamente óptimo para el tratamiento de tumores de pacientes. Los diferentes tumores pueden requerir utilizar anticuerpos anti-tumor específicos y agentes anti-neoplásticos específicos que serán determinados en un paciente para bases del paciente. Las rutas de administración incluyen por ejemplo administración, oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis del antagonista administrado depende de numerosos factores incluyendo por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y severidad del tumor a ser tratado y la ruta de administración de los antagonistas. Debe hacerse énfasis de que la presente invención no está limitada a ningún método particular o ruta de administración.

Alguna persona calificada en el arte puede entender que las dosificaciones y la frecuencia del tratamiento dependerán de la tolerancia individual del paciente y de las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas de bloqueo o inhibición del agente utilizado. Idealmente, se busca alcanzar farmacocinéticas saturables para el agente utilizado. Una dosis de carga para un anticuerpo anti-EGFR puede tener un rango, por ejemplo, de aproximadamente 10 a 1000 mg/m², de preferencia de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/m². Esto puede ser seguido por dosificaciones diarias o semanales en un rango, de por ejemplo de desde aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/m². El paciente es monitoreado para efectos colaterales y el tratamiento es detenido cuando dichos efectos colaterales son severos.

Alguien calificado en el arte puede también conocer como monitorear el progreso del tratamiento con la finalidad de determinar la dosis efectiva. Por ejemplo, una manera es MRI, CT monitoreo u otros escaneos del cerebro.

Ejemplos

Ejemplo 1. El siguiente ejemplo describe un método para tratar tumores sólidos refractarios mediante la administración de una combinación de irinotecan y un anticuerpo EGFR.

De Agosto del 2005 a Marzo del 2006, fue administrado irinotecan y diferentes niveles de dosis de cetuximab a 20 pacientes

pediátricos con tumores sólidos refractarios y esperanza de vida de al menos 8 semanas. Los pacientes fueron divididos en dos grupos (edades 1-12= Arm A, y 13-18= Arm B) con los siguientes tipos de tumores: glioma del tallo cerebral/ astrocitoma (10), hepatoblastoma, osteosarcoma (1), ependimoma (1), neuroblastoma (1), rhabdomyosarcoma (1) y otros (5). El irinotecan fue administrado a una dosis de 20 mg/m²/día como una infusión de 60 minutos por 5 días por 2 semanas, cada 21 días. Los horarios de dosis y el número de sujetos con dosis tóxicas limitantes (DLTs) son proporcionados en la Tabla 1.

TABLA 1

Arm	Nivel de Dosis	Cetuximab (mg/m ² días 1, 8, 15)	Irinotecan (mg/m ² días 1-5 y 8-12)	No. de sujetos	No. de sujetos con DLT (dosis tóxica limitante)
A	1	75	20	6	1 (Gr 3 diarrea)
A	2	150	20	6	2 (Gr 4 neutropenia, Gr3 diarrea)
B	1	75	20	8	1 (Gr3 diarrea)

Debido a los DLTs experimentados por dos pacientes externos de los seis pacientes en Arm A, nivel de dosis 2, que se estimó estaban relacionados con el irinotecan, éste fue reducido a 16 mg/m². Un sujeto en Arm B experimentó una reacción de infusión de Grado 3 y el tratamiento fue discontinuado. Otro observó toxicidades que incluyeron comezón de grado 1.

Un sujeto con un glioma de grado alto negativo de EGFR (grupo

A nivel de dosis 1) alcanzó una respuesta parcial y está actualmente en el ciclo 13. Un sujeto con Neuroblastoma (grupo A nivel de dosis 1) ha experimentado una respuesta menor y está actualmente recibiendo el ciclo 9. Siete sujetos tuvieron una mejor respuesta de padecimiento estable por un promedio de 3.4 meses (rango de 2-7+meses).

En conclusión, la combinación del cetuximab y el irinotecan muestra prometer actividad anti-cáncer en tumores sólidos pediátricos.

La descripción precedente y el ejemplo han sido expuestos únicamente para ilustrar la invención y no intentan ser limitantes. Cada uno de los aspectos y modalidades descritas de la presente invención pueden ser consideradas individualmente o en combinación con otros aspectos, la presente invención puede mostrar solo ciertas figuras, tales características pueden ser incorporadas a la invención. En suma, a menos que se especifique algo diferente, ninguno de los pasos de los métodos de la presente invención está limitado a cualquier ningún orden particular de realización. Las modificaciones de las modalidades expuestas incorporan el espíritu y la sustancia de la invención para quienes están calificados en el arte y tales modificaciones están dentro del alcance de la presente invención. Además, todas las referencias aquí citadas están incorporadas mediante referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. un método para inhibir el crecimiento de un tumor en un paciente pediátrico que comprende tratar al paciente pediátrico con una cantidad efectiva de un antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y un agente quimioterapéutico.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tumor es un tumor refractario.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tumor es un glioma.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el tumor es un neuroblastoma.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el antagonista es un anticuerpo o fragmento del mismo.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo enlaza al dominio extracelular del EGFR.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe el enlace de un ligando EGFR y un EGFR y neutraliza la activación del mismo.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo es cetuximab.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal

10. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es quimérico.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es humanizado.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es humano.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente quimioterapéutico es irinotecan.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además administrar radiación al paciente pediátrico.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 January 2008 (31.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/014386 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/074448

(22) International Filing Date: 26 July 2007 (26.07.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/833,487 27 July 2006 (27.07.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **IM-CLONE SYSTEMS INCORPORATED** [US/US]; 180 Varick Street, New York, NY 10014 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): **ROWINSKY, Eric** [US/US]; 5 Robin Road, Warren, NJ 07059 (US).

(74) Agent: **MERCANTI, Michael, N.**; Lucas & Mercanti, Llp, 475 Park Avenue South, New York, NY 10016 (US).

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

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2008/014386 A2

(54) Title: TREATMENT OF TUMORS IN PEDIATRIC PATIENTS WITH EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR ANTAGONISTS

(57) Abstract: Combination therapy methods of treating pediatric tumors by administering an EGFR antagonist and a chemotherapeutic agent are disclosed. The methods also include treating refractory pediatric tumors.

TREATMENT OF TUMORS IN PEDIATRIC PATIENTS WITH EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR ANTAGONISTS

5

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of U.S. provisional patent application Ser. No. 60/833,487, filed on July 27, 2006, the contents of which are incorporated by reference
10 herein in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to treating tumors in pediatric patients by administering a combination of an EGFR antagonist and a chemotherapeutic agent.
15

BACKGROUND OF THE INVENTION

In the United States, 11,900 children and adolescents under the age of 20 were diagnosed with cancer in 2001 and about 2,200 died of the disease. Solid tumors account for approximately 30% of cases of childhood cancers. Invasive brain and nervous system
20 cancers accounts for 17% of all pediatric cancers, second only to acute lymphocytic leukemia. About half of the diagnosed cases of brain tumors are malignant. Other common childhood cancers include Ewing's sarcoma, leukemia, neuroblastoma, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, soft tissue sarcoma, and Wilms' tumors.

One of the major obstacles in treating brain tumors in children is that the brain is
25 still undergoing rapid development and is vulnerable to toxicities from treatments such as radiation or chemotherapy. Obstacles also arise in treating other types of childhood cancers. Therefore, new therapies for treating tumors in pediatric patients are needed.

The epidermal growth factor receptor (EGFR) family is expressed or over-expressed in various cancers and is generally involved in tumorigenesis. The EGFR family
30 includes the EGF receptor (EGFR, also known as erbB-1/HER1), HER2 (also known as c-neu/erbB-2), erbB-3/HER3, and erbB-4/HER4. For example, EGFR and HER2 are thought to play a critical role in processes that regulate tumor cell growth and survival. In particular, EGFR has been implicated in several pathways that affect survival and protection from apoptosis, dedifferentiation, and metastasis (including cell migration and
35 invasion). Among those cancers that express EGFR are some of the most prevalent including head and neck, colorectal, pancreatic, ovarian, renal cell, non-small cell lung,

and gliomas. Prognosis for many of these cancers is poor if not diagnosed at an early stage, and therapy for advanced disease is limited.

There are various EGFR inhibitors currently in clinical trials for the treatment of some of these cancers. One such example is ERBITUX® (cetuximab) (manufactured by ImClone Systems Inc.), which is a chimeric (human/mouse) monoclonal antibody that blocks ligand binding to EGFR, prevents receptor activation, and inhibits growth of cells in culture. Another example is ABX-EGF, which is a fully human monoclonal antibody specific to EGFR that reportedly blocks binding of transforming growth factor alpha (TGF- α) and epidermal growth factor (EGF), two ligands that are known to bind to EGFR. HERCEPTIN® (trastuzumab) is a humanized antibody approved for the treatment of HER2 positive metastatic breast cancer, which is designed to target and block the function of HER2 protein overexpression.

In addition, clinical trials are currently being conducted on various small molecule EGFR inhibitors. An example of a tyrosine kinase inhibitor is IRESSA™, which is a small molecule EGFR tyrosine kinase inhibitor that reportedly inhibits EGFR tyrosine kinase activity, is cytostatic towards a range of human cancer cells that express functional EGFR, and can inhibit tumor cell proliferation via up-regulation of p27.

SUMMARY OF THE INVENTION

In certain embodiments, the present invention provides a method of inhibiting the growth of a tumor in a pediatric patient by treating the pediatric patient with an effective amount of an EGFR antagonist and a chemotherapeutic agent. In a preferred embodiment, the EGFR antagonist is an EGFR antibody that specifically binds to the extracellular domain of EGFR and neutralized activation thereof. In a preferred embodiment, the chemotherapeutic agent is irinotecan.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention provides methods of treating tumors in pediatric patients by administering an effective amount of an EGFR antagonist and a chemotherapeutic agent. Pediatric patients, according to the present invention, are patients from birth to 18 years of age. Treatment includes: (1) preventing the disease from occurring in a patient who may be predisposed to the disease but does not yet experience or display symptoms of the disease; *e.g.*, prevention of the outbreak of the clinical symptoms; (2) inhibiting the growth of the tumor, *e.g.*, arresting its development; or (3) relieving the tumor, *e.g.*,

causing regression of the symptoms of the tumor. Inhibiting tumor growth includes slowing or stopping growth, as well as causing tumor regression. An effective amount for the treatment of a disease means that amount which, when administered to a patient in need thereof, is sufficient to effect treatment, as defined above of the disease.

5 The tumors that are treated according to the present invention are any of the tumors that express EGFR. Such tumors include blastomas, including hepatoblastomas and neuroblastomas; carcinomas, including adenocarcinomas; gliomas, including
10 ependymomas, astrocytomas, oligodendrogliomas and mixed gliomas; sarcomas, including rhabdomyosarcomas and adenosarcomas; and adenomas. The tumors can occur in virtually all parts of the body, including, for example, the breast, heart, lung, esophagus, small intestine, colon, rectum, stomach, spleen, kidney, bladder, head and neck, larynx, ovary, prostate, brain, pancreas, skin, bone, bone marrow, blood, thymus, uterus, testicles, cervix, or liver. In a preferred embodiment, the tumors are tumors of the nervous system
15 such as gliomas and neuroblastomas. The tumors to be treated include primary and metastatic tumors, as well as refractory tumors. "Refractory tumors" include tumors that fail to respond or are resistant to treatment with chemotherapeutic agents alone, antibodies alone, radiation alone or combinations thereof. Refractory tumors also encompass tumors that appear to be inhibited by treatment with such agents, but recur up to five years, sometimes up to ten years or longer after treatment is discontinued.

20 An EGFR antagonist, according to the present invention can be an extracellular antagonist or an intracellular antagonist and more than one antagonist may be employed. Extracellular antagonists include, but are not limited to, proteins or other biological molecules that bind to EGFR. In certain embodiments of the invention, an extracellular antagonist binds to the extracellular domain of EGFR and inhibits binding of EGFR to one
25 or more of its ligands and/or neutralizes ligand-induced activation of EGFR. Ligands for EGFR include EGF, TGF- α , amphiregulin, heparin-binding EGFR (HB-EGF) and betacellulin. Extracellular EGFR antagonists can also include substances that inhibit EGFR dimerization with other EGFR receptor subunits (*i.e.* EGFR homodimers) or heterodimerization with other growth factor receptors (*e.g.*, HER2).

30 In a preferred embodiment, the EGFR antagonist is an antibody that binds to EGFR and blocks ligand binding. One example of an EGFR antibody is cetuximab (IMC-C225) (GenBank Accession No. 1NQLA), which is a chimeric (human/mouse) IgG monoclonal antibody. *See e.g.*, U.S. Patent No. 4,943,533 (Mendelsohn *et al.*); U.S. Patent No. 6,217,866 (Schlessinger *et al.*); U.S. Application Nos. 08/973,065 (Goldstein *et al.*)

and 09/635,974 (Teufel); WO 99/60023 (Waksal *et al.*) and WO 00/69459, all of which are incorporated by reference herein. Cetuximab specifically binds to EGFR and blocks binding of a ligand, such as EGF. Cetuximab Fab contains the Fab fragment of Cetuximab, *i.e.*, the heavy and light chain variable region sequences of murine antibody M225 (U.S. App. Ser. No. 2004/0006212, incorporated herein by reference) with human IgG1 C_H1 heavy and kappa light chain constant domains. (Cetuximab includes all three IgG1 heavy chain constant domains.) The CDR regions of the heavy chain of cetuximab have the following sequences: a CDR1 region with a sequence of N Y G V H (SEQ ID NO: 1), a CDR2 region with a sequence of V I W S G G N T D Y N T P F T S (SEQ ID NO: 2), and a CDR3 region with a sequence of A L T Y Y D Y E F A Y (SEQ ID NO: 3). The CDR regions of the light chain of cetuximab have the following sequences: a CDR1 region with a sequence of R A S Q S I G T N I H (SEQ ID NO: 4), a CDR2 region with a sequence of Y A S E S I S (SEQ ID NO: 5), and a CDR3 region with a sequence of Q Q N N N W P T T (SEQ ID NO: 6).

15. Another example of an EGFR antibody is ABX-EGF, which is a fully human IgG₂ monoclonal antibody specific for EGFR. ABX-EGF binds EGFR with high specificity, blocking binding of EGFR to both of its ligands, EGF and TGF- α . *See e.g.*, Figlin *et al.*, Abstract 1102 presented at the 37th Annual Meeting of ASCO, San Francisco, CA, 12-15 May 2001, which is incorporated by reference herein. The sequence and characterization of ABX-EGF, which was formerly known as clone E7.6.3, is disclosed in U.S. Patent No. 6,235,883 (Abgenix, Inc.) at col. 28, line 62 through col. 29, line 36 and in Fig. 29-34, which is incorporated by reference herein. (*See also* Yang *et al.*, *Critical Rev. Oncol./Hematol.*, 38(1): 17-23, 2001, which is incorporated by reference herein.)

25 Another examples of an EGFR antibody is HERCEPTIN® (trastuzumab), which is a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody that selectively binds with high affinity in a cell-based assay (K_d of 5 nM) to the extracellular domain of the human EGFR2 protein, HER2. The antibody is an IgG₁ kappa that contains human framework regions with the complementarity-determining regions of a murine antibody (4D5) that binds to HER2. *See, e.g.*, International Patent Publication No. WO 01/89566 (Mass), which is incorporated by reference herein.

30 Other EGFR antibodies include EMD 72000 (Merck KGaA), which is a humanized version of the murine anti-EGFR monoclonal antibody EMD 55900; h-R3 (TheraCIM), which is a humanized anti-EGFR monoclonal antibody; Y10, which is a murine monoclonal antibody and was raised against a murine homologue of the human

EGFRvIII mutation; and MDX-447 (Medarex). See U.S. Patent Nos. 5,558,864 (Bendig et al.), 5,884,093 (Kettleborough et al.), and 5,891,996 (Mateo de Acosta del Rio et al.), all of which are incorporated by reference herein.

Intracellular EGFR antagonists can be biological molecules, but are usually small molecules, such as synthetic kinase inhibitors that act directly on the cytoplasmic domain of EGFR to inhibit EGFR-mediated signal transduction. One example of a small molecule EGFR antagonist is IRESSATM (ZD1939), which is a quinoxaline derivative that functions as an ATP-mimetic to inhibit EGFR. See U.S. Patent No. 5,616,582 (Zeneca Limited); WO 96/33980 (Zeneca Limited) at p. 4; see also, Rowinsky et al., Abstract 5 presented at the 37th Annual Meeting of ASCO, San Francisco, CA, 12-15 May 2001; Anido et al., Abstract 1712 presented at the 37th Annual Meeting of ASCO, San Francisco, CA, 12-15 May 2001. Another example of a small molecule EGFR antagonist is TARCEVA® (OSI-774), which is a 4-(substitutedphenylamino)quinoxaline derivative [6,7-Bis(2-methoxyethoxy)-quinazolin-4-yl]- (3-ethynyl-phenyl)amine hydrochloride] EGFR inhibitor. See WO 96/30347 (Pfizer Inc.) at, for example, page 2, line 12 through page 4, line 34 and page 19, lines 14-17. See also Moyer et al., *Cancer Res.*, 57: 4838-48 (1997); Pollack et al., *J. Pharmacol.*, 291: 739-48 (1999). TARCEVA® may function by inhibiting phosphorylation of EGFR and its downstream PI3/Akt and MAP (mitogen activated protein) kinase signal transduction pathways resulting in p27-mediated cell-cycle arrest. See Hidalgo et al., Abstract 281 presented at the 37th Annual Meeting of ASCO, San Francisco, CA, 12-15 May 2001.

Other small molecules are also reported to inhibit EGFR, many of which are thought to be specific to the tyrosine kinase domain of an EGFR. Some examples of such small molecule EGFR antagonists are described in WO 91/116051, WO 96/30347; WO 96/33980, WO 97/27199 (Zeneca Limited), WO 97/30034 (Zeneca Limited), WO 97/42187 (Zeneca Limited), WO 97/49688 (Pfizer Inc.), WO 98/33798 (Warner Lambert Company), WO 00/18761 (American Cyanamid Company), and WO 00/31048 (Warner Lambert Company). Examples of specific small molecule EGFR antagonists include CI-1033 (Pfizer), which is a quinoxaline (N-[4-(3-chloro-4-fluoro-phenylamino)-7-(3-morpholin-4-yl-propoxy)-quinazolin-6-yl]-acrylamide) inhibitor of tyrosine kinases, particularly EGFR and is described in WO 00/31048 at page 8, lines 22-6; PKI166 (Novartis), which is a pyrrolopyrimidine inhibitor of EGFR and is described in WO 97/27199 at pages 10-12; GW2016 (GlaxoSmithKline), which is an inhibitor of EGFR and HER2; EKB569 (Wyeth), which is reported to inhibit the growth of tumor cells that

overexpress EGFR or HER2 *in vitro* and *in vivo*; AG-1478 (Tryphostin), which is a quinazoline small molecule that inhibits signaling from both EGFR and erbB-2; AG-1478 (Sugen), which is a bisubstrate inhibitor that also inhibits protein kinase CK2; PD 153035 (Parke-Davis) which is reported to inhibit EGFR kinase activity and tumor growth, induce
5 apoptosis in cells in culture, and enhance the cytotoxicity of cytotoxic chemotherapeutic agents; SPM-924 (Schwarz Pharma), which is a tyrosine kinase inhibitor targeted for treatment of prostate cancer; CP-546,989 (OSI Pharmaceuticals), which is reportedly an inhibitor of angiogenesis for treatment of solid tumors; ADL-681, which is a EGFR kinase inhibitor targeted for treatment of cancer; PD 158780, which is a pyridopyrimidine that is
10 reported to inhibit the tumor growth rate of A4431 xenografts in mice; CP-358,774, which is a quinazoline that is reported to inhibit autophosphorylation in HNS xenografts in mice; ZD1839, which is a quinazoline that is reported to have antitumor activity in mouse xenograft models including vulvar, NSCLC, prostate, ovarian, and colorectal cancers; CGP 59326A, which is a pyrrolopyrimidine that is reported to inhibit growth of EGFR-
15 positive xenografts in mice; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 and CGP53353 (Novartis), which are dianilnaphthalimides. Naturally derived EGFR tyrosine kinase inhibitors include genistein, herbimycin A, quercetin, and erstatin.

Further small molecules reported to inhibit EGFR and that are therefore within the scope of the present invention are tricyclic compounds such as the compounds described
20 in U.S. Patent No. 5,679,683; quinazoline derivatives such as the derivatives described in U.S. Patent No. 5,616,582; and indole compounds such as the compounds described in U.S. Patent No. 5,196,446.

It will be appreciated that useful small molecule to be used in the invention are inhibitors of EGFR, but need not be completely specific for EGFR.

25 In a preferred embodiment, the EGFR antagonist is an anti-EGFR antibody that exhibits one or more of following properties:

1) The antibody binds to the external domain of EGFR and inhibits ligand binding. Inhibition can be determined, for example, by a direct binding assay using purified or membrane bound receptor. In this embodiment, the antibodies of the present invention or
30 fragments thereof, preferably bind EGFR at least as strongly as the natural ligands of EGFR (EGF, TGF- α).

2) The antibodies neutralize EGFR. Binding of a ligand to an external, extracellular domain of EGFR stimulates tyrosine kinase activity and receptor phosphorylation and/or the phosphorylation of other proteins involved in the various

signaling pathways. Neutralization of EGFR includes inhibition, diminution, inactivation and/or disruption of one or more of the activities normally associated with signal transduction. Neutralization can be determined *in vivo*, *ex vivo*, or *in vitro* using, for example, tissues, cultured cell, or purified cellular components.

- 5 One measure of EGFR neutralization is inhibition of the tyrosine kinase activity of the receptor. Tyrosine kinase inhibition can be determined using well-known methods; for example, by measuring the autophosphorylation level of recombinant kinase receptor, and/or phosphorylation of natural or synthetic substrates. Thus, phosphorylation assays are useful in determining neutralizing antibodies in the context of the present invention.
- 10 Phosphorylation can be detected, for example, using an antibody specific for phosphotyrosine in an ELISA assay or on a western blot. Some assays for tyrosine kinase activity are described in Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 283: 1433-44 (1997) and Batley et al., *Life Sci.* 62:143-50 (1998). Antibodies of the invention cause a decrease in tyrosine phosphorylation of EGFR of at least about 75%, preferably at least about 85%,
- 15 and more preferably at least about 90% in cells that respond to ligand.

 Another measure of EGFR neutralization is inhibition of phosphorylation of downstream substrates of EGFR. Accordingly, the level of phosphorylation of MEK and ERK can be measured. The decrease in phosphorylation is at least about 40%, and can be at least about 60%, or at least about 80%.

- 20 In addition, methods for detection of protein expression can be utilized to determine EGFR neutralization, wherein the proteins being measured are regulated by EGFR tyrosine kinase activity. These methods include immunohistochemistry (IHC) for detection of protein expression, fluorescence in situ hybridization (FISH) for detection of gene amplification, competitive radioligand binding assays, solid matrix blotting
- 25 techniques, such as Northern and Southern blots, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and ELISA. See, e.g., Grandis et al., *Cancer*, 78:1284-92 (1996); Shimizu et al., *Japan J. Cancer Res.*, 85:567-71 (1994); Sauter et al., *Am. J. Path.*, 148:1047-53 (1996); Collins, *Glia* 15:289-96 (1995); Radinsky et al., *Clin. Cancer Res.* 1:19-31 (1995); Petrides et al., *Cancer Res.* 50:3934-39 (1990); Hoffmann et al.,
- 30 *Anticancer Res.* 17:4419-26 (1997); Wikstrand et al., *Cancer Res.* 55:3140-48 (1995).

Ex vivo assays can also be utilized to determine EGFR neutralization. For example, receptor tyrosine kinase inhibition can be observed by mitogenic assays using cell lines stimulated with receptor ligand in the presence and absence of inhibitor. An example of such a mitogenic assay is a 3T3 cells mitogenic assay (3T3 (clone A31-714)

50

cells from American Type Culture Collection (Manassas, VA)). Another method involves testing for inhibition of growth of EGFR-expressing tumor cells or cells transfected to express EGFR. Inhibition can also be observed using tumor models, for example, human tumor cells injected into a mouse.

5 The antibodies of the present invention are not limited by any particular mechanism of EGFR neutralization. The anti-EGFR antibodies of the present invention can bind externally to EGFR cell surface receptor, block binding of ligand and subsequent signal transduction mediated via the receptor-associated tyrosine kinase, and prevent phosphorylation of the EGFR and other downstream proteins in the signal transduction
10 cascade.

3) The antibodies down modulate EGFR. The amount of EGFR present on the surface of a cell depends on receptor protein production, internalization, and degradation. The amount of EGFR present on the surface of a cell can be measured indirectly, by detecting internalization of the receptor or a molecule bound to the receptor. For example,
15 receptor internalization can be measured by contacting cells that express EGFR with a labeled antibody. Membrane-bound antibody is then stripped, collected and counted. Internalized antibody is determined by lysing the cells and detecting label in the lysates.

Another way is to directly measure the amount of the receptor present on the cell following treatment with an anti-EGFR antibody or other substance, for example, by
20 fluorescence-activated cell-sorting analysis of cells stained for surface expression of EGFR. Stained cells are incubated at 37°C and fluorescence intensity measured over time. As a control, part of the stained population can be incubated at 4°C (conditions under which receptor internalization is halted).

Another measure of down-modulation is reduction of the total receptor protein
25 present in a cell, and reflects degradation of internal receptors. Accordingly, treatment of cells (particularly cancer cells) with antibodies of the invention results in a reduction in total cellular EGFR. In a preferred embodiment, the reduction is at least about 70%, more preferably at least about 80%, and even more preferably at least about 90%.

For treatment of human subjects, antibodies according to the invention are
30 preferably human. Alternatively, the antibodies can be from non-human primates or other mammals, or be humanized or chimeric antibodies.

Antibody fragments according to the invention can be produced by cleaving a whole antibody, or by expressing DNA that encodes the fragment. Fragments of antibodies may be prepared by methods described by Lamoyi et al., *J. Immunol. Methods*,

56: 235-243 (1983) and by Parham, *J. Immunol.* 131: 2895-2902 (1983). Such fragments may contain one or both Fab fragments or the F(ab')₂ fragment. Such fragments may also contain single-chain fragment variable region antibodies, i.e. scFv, dibodies, or other antibody fragments. Methods of producing such functional equivalents are disclosed in
5 PCT Application WO 93/21319, European Patent Application No. EP 239400; PCT Application WO 89/09622; European Patent Application EP 338745; and European Patent Application EP 332424.

Preferred host cells for transformation of vectors and expression of the antibodies of the present invention are mammalian cells, e.g., COS-7 cells, Chinese hamster ovary
10 (CHO) cells, and cell lines of lymphoid origin such as lymphoma, myeloma (e.g. NS0), or hybridoma cells. Other eukaryotic hosts, such as yeasts, can be alternatively used.

The transformed host cells are cultured by methods known in the art in a liquid medium containing assimilable sources of carbon (carbohydrates such as glucose or lactose), nitrogen (amino acids, peptides, proteins or their degradation products such as
15 peptones, ammonium salts or the like), and inorganic salts (sulfates, phosphates and/or carbonates of sodium, potassium, magnesium and calcium). The medium furthermore contains, for example, growth-promoting substances, such as trace elements, for example iron, zinc, manganese and the like.

High affinity anti-EGFR antibodies according to the present invention can be
20 isolated from a phage display library constructed from human heavy chain and light chain variable region genes. For example, a variable domain of the invention can be obtained from a peripheral blood lymphocyte that contains a rearranged variable region gene. Alternatively, variable domain portions, such as CDR and FW regions, can be obtained from different sources and recombined. Further, portions of the variable domains (e.g.,
25 FW regions) can be synthetic consensus sequences.

Antibodies and antibody fragments of the present invention can be obtained, for example, from naturally occurring antibodies, or Fab or scFv phage display libraries. It is understood that, to make a single domain antibody from an antibody comprising a V_H and a V_L domain, certain amino acid substitutions outside the CDRs can be desired to enhance
30 binding, expression or solubility. For example, it can be desirable to modify amino acid residues that would otherwise be buried in the V_H-V_L interface.

Further, antibodies and antibody fragments of the invention can be obtained by standard hybridoma technology (Harlow & Lane, ed., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), which is incorporated by reference herein) using

transgenic mice (*e.g.*, KM mice from Medarex, San Jose, Calif.) that produce human immunoglobulin gamma heavy and kappa light chains. In a preferred embodiment, a substantial portion of the human antibody producing genome is inserted into the genome of the mouse, and is rendered deficient in the production of endogenous murine antibodies.

- 5 Such mice may be immunized subcutaneously (*s.c.*) with PDGFR α (usually in complete Freund's adjuvant) with boosts as needed. Immunization methods are well known in the art.

Antibodies that can be used according to the invention include complete immunoglobulins, antigen binding fragments of immunoglobulins, as well as antigen
10 binding proteins that comprise antigen binding domains of immunoglobulins. Antigen binding fragments of immunoglobulins include, for example, Fab, Fab', and F(ab')₂. Other antibody formats have been developed which retain binding specificity, but have other characteristics that may be desirable, including for example, bispecificity, multivalence (more than two binding sites), compact size (*e.g.*, binding domains alone).

- 15 Single chain antibodies lack some or all of the constant domains of the whole antibodies from which they are derived. Therefore, they can overcome some of the problems associated with the use of whole antibodies. For example, single-chain antibodies tend to be free of certain undesired interactions between heavy-chain constant regions and other biological molecules. Additionally, single-chain antibodies are
20 considerably smaller than whole antibodies and can have greater permeability than whole antibodies, allowing single-chain antibodies to localize and bind to target antigen-binding sites more efficiently. Furthermore, the relatively small size of single-chain antibodies makes them less likely to provoke an unwanted immune response in a recipient than whole antibodies.

- 25 Multiple single chain antibodies, each single chain having one V_H and one V_L domain covalently linked by a first peptide linker, can be covalently linked by at least one or more peptide linker to form a multivalent single chain antibodies, which can be monospecific or multispecific. Each chain of a multivalent single chain antibody includes a variable light chain fragment and a variable heavy chain fragment, and is linked by a
30 peptide linker to at least one other chain. The peptide linker is composed of at least fifteen amino acid residues. The maximum number of amino acid residues is about one hundred.

Two single chain antibodies can be combined to form a diabody, also known as a bivalent dimer. Diabodies have two chains and two binding sites, and can be monospecific or bispecific. Each chain of the diabody includes a V_H domain connected to

a V_L domain. The domains are connected with linkers that are short enough to prevent pairing between domains on the same chain, thus driving the pairing between complementary domains on different chains to recreate the two antigen-binding sites.

Three single chain antibodies can be combined to form triabodies, also known as
5 trivalent trimers. Triabodies are constructed with the amino acid terminus of a V_L or V_H domain directly fused to the carboxyl terminus of a V_L or V_H domain, i.e., without any linker sequence. The triabody has three Fv heads with the polypeptides arranged in a cyclic, head-to-tail fashion. A possible conformation of the triabody is planar with the three binding sites located in a plane at an angle of 120 degrees from one another.

10 Triabodies can be monospecific, bispecific or trispecific.

Thus, antibodies of the invention and fragments thereof include, but are not limited to, naturally occurring antibodies, bivalent fragments such as (Fab')₂, monovalent fragments such as Fab, single chain antibodies, single chain Fv (scFv), single domain antibodies, multivalent single chain antibodies, diabodies, triabodies, and the like that bind
15 specifically with antigens.

According to the present invention, an EGFR antagonist is administered in combination with one or more anti-neoplastic agents. As employed herein, the term, "anti-neoplastic" agent excludes an EGFR antagonist, unless otherwise specified. Any suitable anti-neoplastic agent can be used, such as a chemotherapeutic agent, radiation, or
20 combinations thereof. The anti-neoplastic agent can be an alkylating agent or an anti-metabolite. Examples of alkylating agents include, but are not limited to, cisplatin, cyclophosphamide, melphalan, and dacarbazine. Examples of anti-metabolites include, but are not limited to doxorubicin, daunorubicin, paclitaxel, and gemcitabine.

In a preferred embodiment, the anti-neoplastic agent is a chemotherapeutic agent.
25 Preferred chemotherapeutic agents include amifostine (ethyol), cisplatin, dacarbazine (DTIC), dactinomycin, mechlorethamine (nitrogen mustard), streptozocin, cyclophosphamide, carmustine (BCNU), lomustine (CCNU), doxorubicin (adriamycin), doxorubicin lipo (doxil), gemcitabine (gemzar), daunorubicin, daunorubicin lipo (daunoxome), procarbazine, mitomycin, cytarabine, etoposide, methotrexate, 5-fluorouracil, vinblastine, vincristine, bleomycin, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukin, asparaginase, busulfan, carboplatin, cladribine, camptothecin, CPT-11, 10-hydroxy-7-ethyl-camptothecin (SN38), dacarbazine, floxuridine, fludarabine, hydroxyurea, ifosfamide, idarubicin, mesna, interferon alpha, interferon beta, irinotecan, mitoxantrone, topotecan, leuprolide, megestrol, melphalan, mercaptopurine, plicamycin,
30

mitotane, pegaspargase, pentostatin, pipobroman, plicamycin, streptozocin, tamoxifen, teniposide, testolactone, thioguanine, thiotepa, uracil mustard, vinorelbine, chlorambucil and combinations thereof. In a more preferred embodiment, the chemotherapeutic agent is irinotecan.

- 5 An anti-neoplastic agent, including a chemotherapeutic agent and/or an anti-metabolite, is administered in a dose and on a schedule according to the package directions and/or the clinical response of the patient. Such doses will be apparent to one of ordinary skill and do not require undue experimentation. For example, Ironotecan is preferably administered over the recommended dose range of from about 50 to about 350 mg/m²,
10 although the dose may be higher or lower, depending on the clinical response of the patient. Other agents have dosage ranges of from about 1 to about 1,000 mg/m² per administration and/or treatment regimen. Radiation treatment is administered based on the appropriate clinical treatment protocols and/or clinical experience of one of skill in the art.

- In a combination therapy, the EGFR antagonist is administered before, during, or
15 after commencing therapy with another agent, as well as any combination thereof, i.e., before and during, before and after, during and after, or before, during and after commencing the anti-neoplastic agent therapy. For example, an EGFR antibody can be administered between 1 and 30 days, preferably 3 and 20 days, more preferably between 5 and 12 days before commencing radiation therapy. In a preferred embodiment of the
20 invention, chemotherapy is administered concurrently with or, more preferably, subsequent to antibody therapy.

- In the present invention, any suitable method or route can be used to administer the antagonists of the invention, and optionally, to co-administer anti-neoplastic agents and/or antagonists of other receptors. The anti-neoplastic agent regimens utilized according to
25 the invention, include any regimen believed to be optimally suitable for the treatment of the patient's tumor. Different tumors can require use of specific anti-tumor antibodies and specific anti-neoplastic agents, which will be determined on a patient to patient basis. Routes of administration include, for example, oral, intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, or intramuscular administration. The dose of antagonist administered
30 depends on numerous factors, including, for example, the type of antagonists, the type and severity of the tumor being treated and the route of administration of the antagonists. It should be emphasized, however, that the present invention is not limited to any particular method or route of administration.

One of skill in the art would understand that dosages and frequency of treatment depend on the tolerance of the individual patient and on the pharmacological and pharmacokinetic properties of blocking or inhibitory agent used. Ideally, one wishes to achieve saturable pharmacokinetics for the agent used. A loading dose for an anti-EGFR antibody can range, for example, from about 10 to about 1000 mg/m², preferably from about 200 to about 400 mg/m². This can be followed by several additional daily or weekly dosages ranging, for example, from about 200 to about 400 mg/m². The patient is monitored for side effects and the treatment is stopped when such side effects are severe.

One of skill in the art would also know how to monitor the progress of the treatment in order to determine an effective dose. For example, one such way is to monitor MRI, CT, or other brain scans.

EXAMPLES

Example 1: The following example discloses a method of treating refractory solid tumors by administering a combination of irinotecan and an EGFR antibody.

From August 2005 to March 2006, 20 pediatric patients with refractory solid tumors and life expectancy of at least 8 weeks were administered irinotecan and different dose levels of cetuximab. The patients were divided into two groups (ages 1-12 = Arm A, and 13-18 = Arm B) with the following tumor types: brainstem glioma/ astrocytoma (10), hepatoblastoma, osteosarcoma (1), ependymoma (1), neuroblastoma (1), rhabdomyosarcoma (1) and other (5). Irinotecan was administered at a dose of 20 mg/m²/day as a 60 minute infusion for 5 days x 2 weeks, every 21 days. The dose schedules and number of subjects with dose-limiting toxicities (DLTs) are provided in Table 1.

Table 1

Arm	Dose level	Cetuximab (mg/m ² /day days 1, 8, 15)	Irinotecan (mg/m ² /day days 1-5 and 8-12)	No. of subjects	No. of subjects with DLT (dose-limiting toxicity)
A	1	75	20	6	1 (Gr 3 diarrhea)
A	2	150	20	6	2 (Gr 4 neutropenia, Gr 3 diarrhea)
B	1	75	20	8	1 (Gr 3 diarrhea)

Due to the DLTs experienced by two out of the six patients in Arm A, dose level 2, which were deemed to be related to irinotecan, irinotecan was de-escalated to 16 mg/m².

One subject in Arm B experienced a Grade 3 infusion reaction and treatment was discontinued. Other observed toxicities included grade 1 rash.

One subject with an EGFR-negative high grade glioma (group A dose level 1) achieved a partial response and is currently in cycle 13. One subject with Neuroblastoma
5 (group A dose level 1) has experienced a minor response and is currently receiving cycle 9. Seven subjects had a best response of stable disease for an average of 3.4 months (ranging from 2- 7+ mo).

In conclusion, the combination of cetuximab and irinotecan shows promising anti-cancer activity in pediatric solid tumors.

10 The foregoing description and example have been set forth merely to illustrate the invention and are not intended as being limiting. Each of the disclosed aspects and embodiments of the present invention may be considered individually or in combination with other aspects, embodiments, and variations of the invention. Further, while certain features of embodiments of the present invention may be shown in only certain figures;
15 such features can be incorporated into other embodiments shown in other figures while remaining within the scope of the present invention. In addition, unless otherwise specified, none of the steps of the methods of the present invention are confined to any particular order of performance. Modifications of the disclosed embodiments incorporating the spirit and substance of the invention may occur to persons skilled in the
20 art and such modifications are within the scope of the present invention. Furthermore, all references cited herein are incorporated by reference in their entirety.

SA

What is claimed is:

1. A method of inhibiting the growth of a tumor in a pediatric patient comprising treating the pediatric patient with an effective amount of an epidermal growth factor
5 receptor (EGFR) antagonist and a chemotherapeutic agent.
2. The method of claim 1, wherein the tumor is a refractory tumor.
3. The method of claim 1, wherein the tumor is a glioma.
- 10 4. The method of claim 1, wherein the tumor is a neuroblastoma.
5. The method of claim 1, wherein the antagonist is an antibody or fragment thereof.
- 15 6. The method of claim 5, wherein the antibody or fragment thereof specifically binds to the extracellular domain of EGFR.
7. The method of claim 5, wherein the antibody or fragment thereof inhibits binding of an EGFR ligand to an EGFR and neutralizes activation thereof.
- 20 8. The method of claim 5, wherein the antibody is cetuximab.
9. The method of claim 5, wherein the antibody or fragment thereof is monoclonal.
- 25 10. The method of claim 5, wherein the antibody or fragment thereof is chimeric.
11. The method of claim 5, wherein the antibody or fragment thereof is humanized.
12. The method of claim 5, wherein the antibody or fragment thereof is human.
- 30 13. The method of claim 1, wherein the chemotherapeutic agent is irinotecan.
14. The method of claim 1, further comprising administering radiation to the pediatric patient.

<110> IMCLONE SYSTEMS, INC.

<120> TRATAMIENTO DE TUMORES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

<130> 1017.52210-TCP

<140>

<141>

<150> 60/833,487

<151> 2006-07-27

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 1

Asn	Tyr	Gly	Val	His
1				5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 2

Val	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Thr	Ser
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 3

Ala	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Ala	Tyr
1				5					10	

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 5

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 6

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
1 5

<110> IMCLONE SYSTEMS, INC.

<120> TREATMENT OF TUMORS IN PEDIATRIC PATIENTS WITH
EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR ANTAGONISTS

<130> 1017.52210-PCT

<140>

<141>

<150> 60/833,487

<151> 2006-07-27

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 1

Asn Tyr Gly Val His

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 2

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Scr

1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 3

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 4
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 5
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide

<400> 6
 Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr
 1 5