

B1

OPS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO

PCT

SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

09-30399

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIONES TERAPEUTICAS PARA POTENCIAR EL EFECTO DE LA TERAPIA CON ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K 39/395, A61K 38/21

71. SOLICITANTE: CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

DOMICILIO: Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, 12100, Ciudad de La Habana - CUBA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

25 MAR. 2009

22. BOGOTA, D.C.,

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION
DEL TRÁMITE**

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (X) MODELO DE UTILIDAD ()	(X)	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	(X)	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	(X)	()
- Descripción de la invención	(X)	()
- Dibujos de ser estos pertinentes	(X)	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	(X)	()

COMPLETA (X) INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

EZQUEMA DE TRAZADO ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica del Esquema de Trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma responsable: 

Fecha: SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-030399- -00000-0000

Fecha: 2009-03-25 13:46:57 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 61



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-030399- -00000-0000

Fecha: 2009-03-25 13:46:57 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 61FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I☒ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: CENTRO DE INMUNOLOGIA
MOLECULARDirección: Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa,
12100, Ciudad de La Habana - CUBANacionalidad o Domicilio: Ciudad de La
Habana - CUBA

Lugar de Constitución: CUBA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

39'779.654

TPA

70,819

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO No. 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/CU2007/000017

Fecha

27/09/2007

Publicación Internacional No.

WO 2008/037225 A1

Fecha

03/04/2008

⑥

Título (54)

COMPOSICIONES TERAPEUTICAS PARA POTENCIAR EL EFECTO DE LA TERAPIA
CON ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDERMICO

⑦

Clasificación Internacional (51)

A61K 39/395, A61K 38/21

⑧

Prioridad

(33) Pais de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

CU

29/09/2006

190-2006

⑨

Comprobante de pago No.

09-22,531

Fecha

Marzo 20 de 2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 Anexos

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

11 FIGURA CARACTERISTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
FIRMA:
C.C. No. 39'779.654 Usaquéen - TPA 70.819 C.S.J.

25 MAR. 2009

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

**ANEXO # 1
INVENTORES**

1. **LUIS ENRIQUE FERNANDEZ MOLINA**
Calle 180 E/1ra. Y 5ta. Edificio A3 apto. 13
Flores, Playa, Ciudad de La Habana 11600
CUBA
2. **GRETA GARRIDO HIDALGO**
Ave. Camaguey No. 11234 apto. 40 E/Pastora y 13
Casino Deportivo, Cerro, Ciudad de La Habana
CUBA
3. **ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ**
Juan Delgado No. 567, entre Acosta y O'farril
10 de Octubre, Ciudad de La Habana
CUBA
4. **BELINDA SANCHEZ RAMIREZ**
Calle 184 entre Ave. 5ta. Y 1ra. Edificio BEE1
Flores, Playa, Ciudad de La Habana
CUBA
5. **AUDRY FERNANDEZ GOMEZ**
Calle 180 E/1ra. Y 5ta. Edificio A3 apto. 13
Flores, Playa, Ciudad de La Habana 11600
CUBA
6. **ALEJANDRO LOPEZ REQUENA**
Juan Bruno Zayas No. 460, apto. 8 entre Carmen y Patrocinio
Víbora, 10 de Octubre, 10500, Ciudad de La Habana
CUBA
7. **IRENE BEAUSOLEIL DELGADO**
Calle 180 No. A3 apto. 17 E/ 5ta. Y 1ra.
Flores, Playa, Ciudad Habana 11600
CUBA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-030399- -00000-0000

Fecha: 2009-03-25 13:46:57 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 61

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 22,531
FECHA : MARZO 20 DE 2009

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	91384086	20/03/2009	5,179,760.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E. S. D.

Ref.: **PODER** conferido por **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra. **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, el poder que me confirió el **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**, con domicilio en **Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, C. Habana 12100, CUBA**, debidamente legalizado ante el Ministerio de Relaciones exteriores el día 23 de Enero de 2001, bajo el número 102503, con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional en Colombia, para: **COMPOSICIONES TERAPEUTICAS PARA POTENCIAR EL EFECTO DE LA TERAPIA CON ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO.-**

De la Señora Jefe,

Acepto


Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá
PBX: 610 74 20

Bogotá, D.C.
XCA/MCA/gcb/ P1730

PRESENTACION PERSONAL Y RECONOCIMIENTO
NOTARIA QUINCE (15) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

EL ANTERIOR ESCRITO FUE PRESENTADO
PERSONALMENTE POR SU SIGNATARIO

Ximena Castellanos Abondano

QUIEN SE IDENTIFICO CON LA C.C. No.

39.773.730 DE Usaquén

[Firma] DEL C.S. de la J.

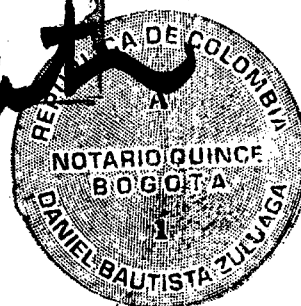
Y RECONOCE SU CONTENIDO COMO CIERTO

19 MAR. 2009

FIRMA COMPARSIENTE:

FECHA:

EL NOTARIO QUINCE:



PRESENTACION PERSONAL Y RECONOCIMIENTO
NOTARIA QUINCE (15) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

EL ANTERIOR ESCRITO FUE PRESENTADO
PERSONALMENTE POR SU SIGNATARIO

Margarita Castellanos Abondano

QUIEN SE IDENTIFICO CON LA C.C. No.

39.779.654 DE Usaquén

[Firma] DEL C.S. de la J.

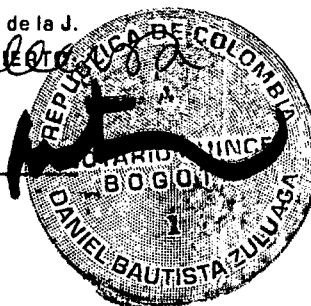
Y RECONOCE SU CONTENIDO COMO CIERTO

19 MAR. 2009

FIRMA COMPARSIENTE:

FECHA:

EL NOTARIO QUINCE:



PODER

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

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

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

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

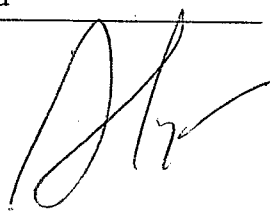
a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industria-
les; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas
y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseññas
comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y
cambio de nombre o domicilio, cancelación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

Dado y firmado hoy 30 de Noviembre de 2000.

en Ciudad de la Habana, Cuba.

Por Agustín Lage Dávila

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



POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned _____

of _____

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

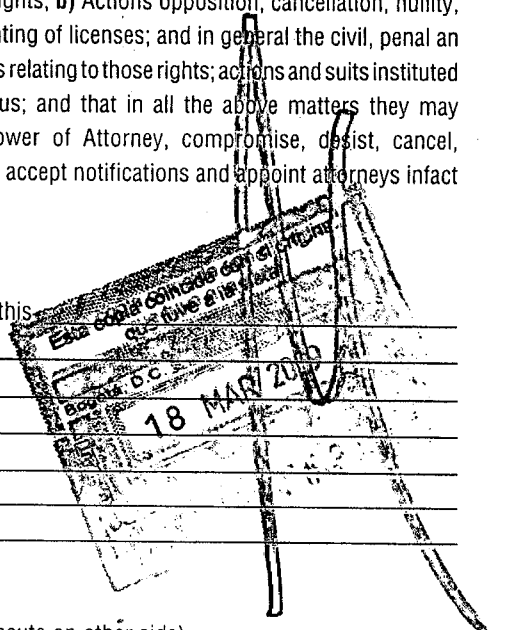
and to obtain the protection of my (our) industrial property, for wich
purpose we authorize the said attorneys to represent us before any
authorities or persons, specially those, administrative, administrative
contentious and judicial, in all matters concerning the following:

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

Given and signed this _____

in _____
By _____

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



Lic. Estrella Díaz Esmeralda
Notario





Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

RECEIVED
CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
LA HABANA, CUBA
10 MAR 2001

No. 1/01

La Habana, Enero 3 del 2001

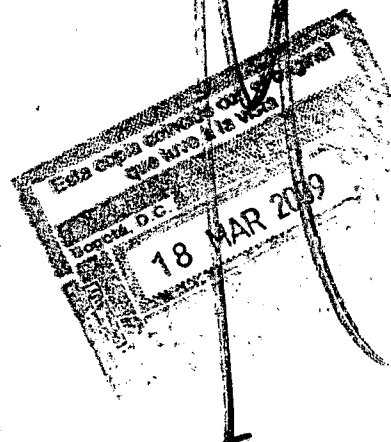
La suscrita Auxiliar Administrativo 5 PA, encargada de funciones consulares, vistos los documentos presentados por los interesados, **CERTIFICA:**

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

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



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



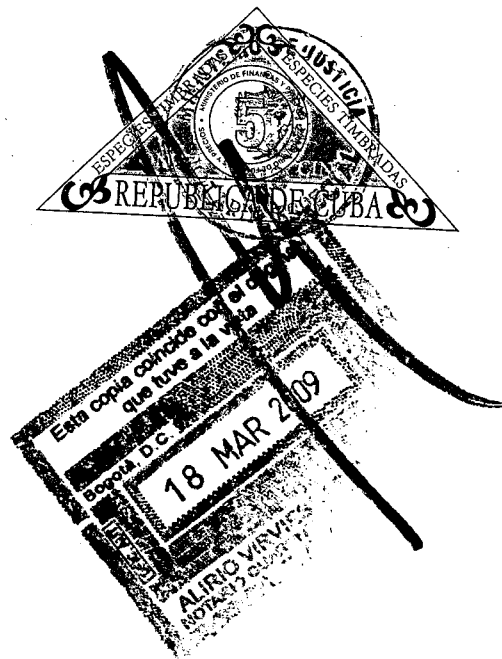
PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

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

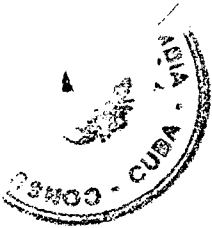
Yo, **LICENCIADA ESTRELLA DIAZ BOSMENIER**. Notaria de la Notaria Especial del Ministerio de Justicia de la República de Cuba, con sede en **GALE Y ASOCIADOS S.A.**, DOY FE que la firma que antecede es la del señor **AGUSTIN BIENVENIDO LAGE DAVILA**, ciudadano cubano, con identidad permanente número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

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



Lic. Estrella Díaz Bosmenier
Notario





Consulado General de Colombia

LA HABANA, CUBA

RECEIVED
CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
LA HABANA, CUBA
10 MAR 2009

No. 1/01

La Habana, Enero 3 del 2001

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

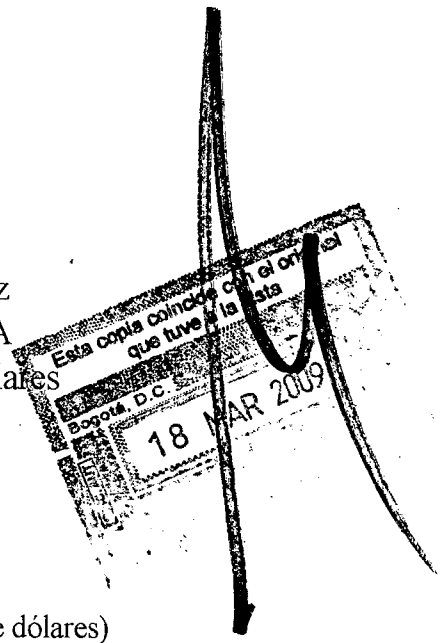
Que la Señora María Silvia Fernández Villar, quien como funcionaria de la Dirección Jurídica del Ministerio de Relaciones Exteriores de la República de Cuba autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este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

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



Vilma Rebeca Gálvez López

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



PAGADOS

IMPUESTO DE TIMBRE NACIONAL
DERECHOS FONDO ROTATORIO
TOTAL PAGADO

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

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

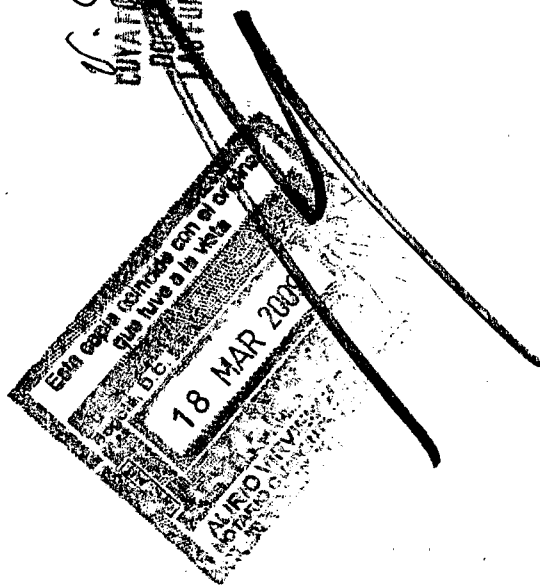
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

102503

2001 JAN 23 10:07

COVATIZA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE REALIZACIONES
SANTIAGO DE BOGOTÁ D.C.



(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Abril de 2008 (03.04.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/037225 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/21 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2007/000017

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de Septiembre de 2007 (27.09.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
190-2006
29 de Septiembre de 2006 (29.09.2006) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**
[CU/CU]; Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa., Ciudad de
La Habana, C.D. 160., Ciudad De La Habana 12100 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **FERNÁN-
DEZ MOLINA, Luis Enrique** [CU/CU]; Calle 180 entre
1ª y 5ta. Edificio A3 apto 13, Flores, Playa., Ciudad De
La Habana, 11600 (CU). **GARRIDO HIDALGO, Greta**
[CU/CU]; Ave. Camaguey No. 11234 apto. 40 entre Pas-
tora y 13., Casino Deportivo, Cerro., Ciudad De La Ha-
bana (CU). **PÉREZ RODRÍGUEZ, Rolando** [CU/CU];
Juan Delgado #567 e/ Acosta y O'farrill, 10 de Oct., Ciu-
dad De La Habana (CU). **SÁNCHEZ RAMÍREZ, Belinda**
[CU/CU]; Calle 184 entre Ave 5ta y 1ra, Edificio BEE1,
Flores, Playa, Ciudad De La Habana 11600 (CU). **FER-
NÁNDEZ GÓMEZ, Audry** [CU/CU]; Calle 180 entre 1ª
y 5ta. Edificio A3 apto 13, Flores., Playa., Ciudad De

La Habana 11600 (CU). **LÓPEZ REQUENA, Alejandro**
[CU/CU]; Juan Bruno Zayas No. 460, apto. 8 entre Carmen
y Patrocinio, Víbora., Ciudad De La Habana 10500 (CU).
BEAUSOLEIL DELGADO, Irene [CU/CU]; Calle 180 #
A3 apto. 17 entre 5ta y 1ra, Flores, Playa., Ciudad De La
Habana 11600 (CU).

(74) Mandatario: **VERDECIA VALDES, Olga**; Ave 1ra esq.
10 # 1001, Ciudad De La Habana 11300 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): 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) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (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:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

(54) Title: THERAPEUTIC COMPOSITIONS FOR BOOSTING THE EFFECT OF ANTIBODY THERAPY AGAINST THE
EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

(54) Título: COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS PARA POTENCIAR EL EFECTO DE LA TERAPIA CON ANTICUERPOS
CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

(57) Abstract: The present invention describes specific therapeutic compositions which increase the effectiveness of monoclonal
antibody (mAb) therapy against the epidermal growth factor receptor (EGFR) and type-I (α/β) interferons (IFNs).

(57) Resumen: La presente invención describe composiciones terapéuticas específicas, que aumentan la eficacia de la terapia con
anticuerpos monoclonales (AcMs) contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, del inglés "epidermal growth
factor receptor") e interferones (INFs) de tipo I (α/β).

WO 2008/037225 A1

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intellectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de Abril de 2008 (03.04.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/037225 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/21 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2007/000017
- (22) Fecha de presentación internacional:
27 de Septiembre de 2007 (27.09.2007)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
190-2006
29 de Septiembre de 2006 (29.09.2006) CU
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU/CU]; Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa., Ciudad de La Habana, C.D. 160., Ciudad De La Habana 12100 (CU).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): FERNÁNDEZ MOLINA, Luis Enrique [CU/CU]; Calle 180 entre 1ª y 5ta. Edificio A3 apto 13, Flores, Playa., Ciudad De La Habana, 11600 (CU). GARRIDO HIDALGO, Greta [CU/CU]; Ave. Camaguey No. 11234 apto. 40 entre Pastora y 13., Casino Deportivo, Cerro., Ciudad De La Habana (CU). PÉREZ RODRÍGUEZ, Rolando [CU/CU]; Juan Delgado #567 el. Acosta y O'farrill, 10 de Oct., Ciudad De La Habana (CU). SÁNCHEZ RAMÍREZ, Belinda [CU/CU]; Calle 184 entre Ave 5ta y 1ra, Edificio BEE1, Flores, Playa, Ciudad De La Habana 11600 (CU). FERNÁNDEZ GÓMEZ, Audry [CU/CU]; Calle 180 entre 1ª y 5ta. Edificio A3 apto 13, Flores., Playa., Ciudad De
- La Habana 11600 (CU). LÓPEZ REQUENA, Alejandro [CU/CU]; Juan Bruno Zayas No. 460, apto. 8 entre Carmen y Patrocinio, Víbora., Ciudad De La Habana 10500 (CU). BEAUSOLEIL DELGADO, Irene [CU/CU]; Calle 180 # A3 apto. 17 entre 5ta y 1ra, Flores, Playa., Ciudad De La Habana 11600 (CU).
- (74) Mandatario: VERDECIA VALDES, Olga; Ave 1ra esq. 10 # 1001, Ciudad De La Habana 11300 (CU).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AI., 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) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LI, 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:
— con informe de búsqueda internacional
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

(54) Title: THERAPEUTIC COMPOSITIONS FOR BOOSTING THE EFFECT OF ANTIBODY THERAPY AGAINST THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

(54) Título: COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS PARA POTENCIAR EL EFECTO DE LA TERAPIA CON ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

(57) Abstract: The present invention describes specific therapeutic compositions which increase the effectiveness of monoclonal antibody (mAb) therapy against the epidermal growth factor receptor (EGFR) and type-I (α/β) interferons (IFNs).

(57) Resumen: La presente invención describe composiciones terapéuticas específicas, que aumentan la eficacia de la terapia con anticuerpos monoclonales (AcMs) contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR, del inglés "epidermal growth factor receptor") e interferones (INFs) de tipo I (α/β).

WO 2008/037225 A1

Composiciones terapéuticas para potenciar el efecto de la terapia con anticuerpos contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.

Sector técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la Biotecnología en particular con la inmunoterapia específica del cáncer. Basado en el efecto sinérgico que tiene sobre el crecimiento de las metástasis el uso combinado de los anticuerpos monoclonales contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (AcMs anti-EGFR) con Interferones (INFs) de tipo I. La presente invención ofrece una herramienta terapéutica que supera las limitaciones de las monoterapias contra el EGFR.

10 Técnica anterior

Anticuerpos monoclonales anti-EGFR

El EGFR y sus ligandos están expresados en todos los tipos celulares a excepción de las células de origen hematopoyético (*Carpenter G. Annu Rev Biochem 1987; 56:881-914*). La expresión incrementada de estas proteínas se ha detectado en la mayoría de los tumores humanos de origen epitelial (*Salomon DS y cols. Crit Rev Oncol Hematol 1995; 19:183-232*). Estudios pre-clínicos han demostrado que los lazos de activación autocrina y paracrina que involucran el EGFR y sus ligandos, regulan el crecimiento y la habilidad de las células tumorales para formar metástasis (*Verbeek BS y cols. FEBS Lett 1998; 425:145-50; O-Chaoenrat P y cols. Int J Cancer 2000; 86:307-17; Radinsky R y cols. Clin Cancer Res 1995; 1:19-31*). Como resultado de estas observaciones, se han identificado un número de potentes y selectivos antagonistas de la señalización a través del EGFR, que se encuentran bajo investigaciones clínicas (*Pal SK, Pegram M. Anticancer Drugs 2005; 16:483-94*).

Actualmente, el AcM quimérico ICM-C225/Cetuximab representa la más exitosa terapia anti-EGFR, encontrándose en la vanguardia de los ensayos clínicos. Este AcM se une específicamente al subdominio III del dominio extracelular del EGFR humano que compite con el ligando y bloquea la activación del receptor, afectando el proceso de dimerización. También induce eficientemente la internalización y la degradación del EGFR (*Shiqing L y cols. Cancer Cell 2005; 7:301-11*). Además, M. Namura y colaboradores demostraron que el Cetuximab puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, siglas en inglés "antibody-dependent cellular cytotoxicity") a través de la activación de las células mononucleares de sangre periférica de humanos, sugiriendo que ésta puede ser otra vía de acción anti-tumoral de este anticuerpo (*Naramura M y cols. Cancer Immunol Immunother 1993; 37:343-9*).

En estudios pre-clínicos usando el AcM Cetuximab, se ha obtenido una remisión completa de tumores xenogénicos EGFR-positivos (*Goldstein J y cols. J Immunol 1997; 158:872-9*).

- Estudios clínicos de Fase I realizados con pacientes de tumores sólidos EGFR-positivos han demostrado que el tratamiento con Cetuximab es bien tolerado (Robert F y cols. *J Clin Oncol* 2001; 19:3234-43; Baselga J y cols. *J Clin Oncol* 2000; 18:904-14; Shin DM y cols. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1204-13). Los principales
- 5 eventos adversos atribuidos a esta terapia han sido reacciones alérgicas y toxicidad en piel (Shin DM y cols. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1204-13). El Cetuximab ha sido recientemente aprobado por la agencia regulatoria para los alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA, del inglés "Food and Drug Administration") para su uso como
- 10 monoterapia o en combinación con Irinotecan en pacientes de carcinoma colorectal metastásico con expresión detectable del EGFR (*ImClone Systems, Erbitux (Cetuximab). US Prescribing Information. ImClone System, 2004*). Adicionalmente, se encuentran en curso estudios clínicos de Fases II y III usando este anticuerpo en pacientes con carcinoma de páncreas (Xiong HQ y cols. *J Clin Oncol* 2004; 22:2610-6), cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC, del inglés "non small cell lung cancer") (Lynch TJ y cols. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; Rosell R y cols. *Proc. Am. Soc Clin. Oncol.* 2004) y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN, del inglés "squamous cell carcinoma of the head and the neck") (Bonner JA y cols. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2004).
- 15 También está siendo evaluado el AcM humanizado h-R3/TheraCIM (Centro de Inmunología Molecular, CIM). Este AcM tiene una capacidad similar al anticuerpo murino original para inhibir la unión del EGF (EGF, del inglés "epidermal growth factor") al receptor (Mateo C y cols. *Immunotechnology* 1997; 3:71-81). En experimentos "in vitro" se ha visto que el h-R3/TheraCIM inhibe el crecimiento de las células A431 de forma similar al AcM Cetuximab. El tratamiento de animales atímicos
- 20 con tumores xenogénicos EGFR-positivos con este anticuerpo resulta en la regresión completa de los tumores establecidos (Viloria-Petit A y cols. *Cancer Res* 2001; 61:5090-101). El h-R3/TheraCIM se encuentra actualmente registrado por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) de Cuba para su uso en pacientes con tumores avanzados de cabeza y cuello (Crombet T y cols. *J Clin Oncol* 2004; 22:1646-54). También se están realizando ensayos clínicos en otras localizaciones como son glioma, mama, próstata y pulmón, obteniéndose resultados alentadores (Crombet T, comunicación personal).
- 25 Otros AcMs específicos por el EGFR humano que presentan mecanismos similares de acción están actualmente bajo investigación clínica. Este es el caso del ABX-EGF, una IgG2 humana, que inhibe la activación dependiente de ligando del EGFR e impide el crecimiento de tumores xenogénicos EGFR-positivos (Yang X y cols. *Cancer Res* 1999; 59:1236-43). Recientemente fueron publicados resultados positivos de la evaluación de este anticuerpo en un ensayo clínico de Fase III en pacientes de cáncer colorectal (Tyagi P. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5:21-3), y están en curso varios
- 35 ensayos clínicos de Fase II en pacientes con cáncer renal (Amato RJ. *Ann Oncol* 2005; 16:7-15) y NSCLC (Tiseo M y cols. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004;
- 40

4:139-48). También está siendo evaluado el AcM humanizado EMD 72 000 en un ensayo clínico en pacientes con tumores de páncreas (Graeven U y cols. *Br J Cancer* 2006; 94:1293-9). No obstante, el beneficio del tratamiento de los pacientes con cáncer metastásico con estos AcMs anti-EGFR es relativamente marginal, sobre todo en lo que se refiere a aumentar la sobrevida. El Erbitux aplicado en los pacientes de cáncer de colon metastásico que son refractarios al tratamiento con Irinotecan, aunque permitió estabilizar la enfermedad unos pocos meses, no logró aumentar la sobrevida de estos pacientes (Cunningham D y cols. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 337-345). Es por esto que es necesario buscar combinaciones terapéuticas que permitan incrementar la eficacia de los AcM anti-EGFr.

Inducción de linfocitos T citotóxicos por terapia pasiva con AcMs

La "presentación cruzada" fue descrita por Michael Bevan 25 años atrás (Bevan MJ. *J Exp Med* 1976; 143: 1283-88), y consiste en la capacidad que tienen las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés "antigen-presenting cells") de activar linfocitos T citotóxicos (CTLs, del inglés "cytotoxic T lymphocytes") específicos por antígenos de células foráneas capturadas por estas y presentados en las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés "major histocompatibility complex") clase I. Se han identificado varios factores que promueven este tipo de presentación, entre estos se encuentran las proteínas de choque térmico (Suto R y Srivastava PK. *Science* 1995; 269: 1585-88), los exosomas (Wolfers J y cols. *Nature Medicine* 2001; 7: 297-303) y los complejos inmunes (Regnault A y cols. *J Exp Med* 1999; 189: 371-80). A su vez las células muertas por apoptosis o necrosis son una fuente muy atractiva de antígenos para la "presentación cruzada". La consecuencia inmunológica de la ingestión de material celular proveniente de apoptosis o necrosis es muy controversial (Russo V y cols. *PNAS* 2000; 97: 2185-90; Yrild BU y cols. *J Exp Med* 2000; 191: 613-21). En general, el material celular necrótico es considerado como inmunogénico, mientras la apoptosis ha estado asociada por mucho tiempo con el evento de tolerización. Sin embargo bajo ciertas condiciones la muerte celular apoptótica ha mostrado ser una atractiva fuente de antígenos para la presentación cruzada y la activación de CTLs por proveer las "señales de peligro" necesarias para la maduración de las APC (Lake RA y Robinson BWS. *Nature Reviews* 2005; 5: 397-405).

El C2B8 (Rituximab) es un AcM quimérico dirigido contra la molécula CD20 (Relf ME y cols. *Blood* 1994; 83: 435-45) Este agente es usado para el tratamiento de linfomas no-Hodgkin de células B, donde provoca una eficiente eliminación de las células B neoplásicas, alcanzándose respuestas objetivas en el 50% de los pacientes e intervalos libres de progresión de la enfermedad por encima de los 12 meses (Maloney DG. *Curr Opin Haematol* 1998; 5:237-43; Coiffier By cols. *Blood* 1998; 92:1927-32; Hainsworth JDy cols. *Blood* 2000; 95:3052-56). Múltiples estudios han indicado que el máximo de respuesta clínica y molecular con el Rituximab se alcanza varios meses

después de aplicado el tratamiento, sugiriendo que los mecanismos citolíticos a corto plazo tales como la apoptosis, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, "complement-dependent cytotoxicity") y la ADCC no son los únicos involucrados. En experimentos "in vitro" el Rituximab promueve la lisis de las células de linfoma a través de alguno de los mecanismos antes mencionados y la fagocitosis de los productos de las células tumorales por las APC y su subsiguiente "presentación cruzada" para activar CTLs específicos por el tumor (Selenko N y cols. *J. Clin. Oncol* 2002; 3:124-130). Este posible "efecto vacunación" no ha sido totalmente constatado en los estudios clínicos, por lo que sin duda alguna son necesarios posteriores ensayos que den resultados más sólidos que puedan apoyar esta hipótesis.

Los Interferones tipo I (α/β) como terapia anti-tumoral

Los INFs tipo I (α/β) son agentes biológicos usados en la terapia de 2 tipos de cáncer principalmente: melanoma y carcinoma renal, (Agarwala SS y Kirkwood JM. *Semin. Surg. Oncol.* 1998; 14: 302-310; Vlock DR y cols. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 1996; 19:433-442; Kirkwood JM y cols. *Semin. Oncol.* 1997; 24: 16-23; Kirkwood JM y cols. *J Clin. Oncol* 1996; 14: 7-17). El INF- α fue la primera citocina producida por la tecnología del ADN recombinante y ha demostrado ser un importante agente regulador de la proliferación y diferenciación de las células tumorales (Hertzog y cols. *J Biol Chem* 1994; 269:14088-93); también se ha reportado su efecto en la inducción de apoptosis (Clemens MJ. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23:277-92) e inhibición de los procesos de angiogénesis (Sidky YA y cols. *Cancer Res* 1987; 47:5155-61). Además de la acción directa sobre las células tumorales, los INF- α/β ejercen una gran variedad de efectos sobre las células inmunes del hospedero que pueden también jugar un papel importante en la respuesta inmune anti-tumoral (Belardelli F. *APMIS.* 1995; 103:161-179). Sin embargo, los datos provenientes de la efectividad clínica del INF- α en la terapia de tumores sólidos son inconsistentes. De hecho, sólo pacientes con determinados tipos de tumores se benefician del tratamiento con esa citocina, mientras otros son parcial o totalmente resistentes a la misma.

Existen estudios del papel del INF- α en la regulación de la expresión del EGFR en células tumorales (Budillon A y cols. *Cancer Res* 1991; 51: 1294-9; Caraglia M y cols. *Int J Cancer* 1995; 4: 309-16; Heise H y cols. *Anti Cancer Drugs* 1995; 6:686-92; Scambia G y cols. *Int J Cancer* 1994; 58: 769-73; Yang JL y cols. *Gut* 2004; 53: 123-129; Qu XJ y cols. *J Urology* 2004; 172: 733-738). Basado en los reportes de que esta citocina incrementa la expresión y actividad del EGFR en algunos tumores, diferentes autores han estudiado "in vitro" la ventaja de combinar inhibidores de la actividad tirosina cinasa del EGFR con INF- α en estos escenarios, obteniendo una ventaja anti-tumoral de la terapia combinada (Yang JL y cols. *Oncology* 2005; 69: 224-238; Brúcese F y cols. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 617-625; Yang JL y cols. *Cancer Letters* 2005; 225: 61-74. Sin embargo estos resultados no pueden ser generalizados pues la acción del INF- α sobre la expresión del EGFR en células tumorales es muy variable

- (Scambia G y cols. Int J Cancer 1994; Yang JL y cols. Gut 2004; 53: 123-129; Qu XJ y cols. J Urology 2004; 172: 733-738), lo cual pudiera limitar la ventaja de este tipo de tratamiento sólo a determinados nichos de pacientes. Por otro lado se ha evidenciado que el INF- α puede incrementar la expresión de las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés "major histocompatibility complex") clase I en los tejidos normales (Cho HJ y cols. J Immunology 2002; 168: 4907-13; Lang KS y cols. Nature Medicine 2005; 11: 138-44). En cambio en esta invención se enseña como la aplicación de INF α a células tumorales en cultivo puede incrementar sustancialmente la expresión de las moléculas de MHC-I, a pesar de que los tumores desarrollan mecanismos de escape a la presión de los efectores inmunológicos, entre ellos la pérdida de la expresión de moléculas de MHC-I. Por estas razones pudiese ser mucho más ventajosa la combinación de esta citocina con AcMs anti-EGFR, lo que potencialmente pudiera inducir una respuesta CTL, efecto que hasta el momento no ha sido atribuido a la acción de ningún inhibidor de actividad tirosina cinasa.
- 15 La presente invención está basada en dos eventos biológicos no descritos ni sugeridos previamente. El primero muestra que la terapia basada en AcMs anti-EGFR depende centralmente de la movilización de CTLs, más particularmente que el efecto anti-metastásico de AcMs contra el EGFR depende directamente de la participación de células T CD8⁺. El segundo evidencia que la acción de los INFs de tipo 1 sobre las células tumorales incrementa considerablemente la expresión de las moléculas de MHC-I. La aplicación combinada de estas dos observaciones permite incrementar notablemente el efecto terapéutico contra el cáncer de los AcM anti-EGFR y de los INFs tipo 1.

25 Descripción detallada de la invención.

- La presente invención está relacionada con una composición terapéutica útil en el tratamiento del cáncer, caracterizada porque comprende la administración simultánea o secuencial de un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más INFs del tipo 1, donde el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo quimérico o la variante humanizada de dicho anticuerpo. Específicamente, la invención trata de la composición terapéutica que comprende el anticuerpo humanizado hR3 que reconoce el receptor humano del EGF y es producido por la línea celular con número de depósito 951110101.

- 35 Por otra parte la composición terapéutica de la presente invención está relacionada con el uso de los INFs de tipo 1 y mas específicamente con INF- α humano y mas específicamente con el INF- α humano recombinante.

Adicionalmente, la presente invención se relaciona con la forma de administración de la composición terapéutica descrita, que puede ser de forma simultánea o secuencial.

En otro aspecto la presente invención se relaciona con un juego de reactivos que comprende un vial conteniendo un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más viales adicionales que contienen uno o más INFs así como una etiqueta u otra instrucción para sus dosificaciones y su uso.

- 5 Dado que por razones éticas es imposible la experimentación en humanos, la presente invención se relaciona además con un biomodelo experimental que permite demostrar en vivo la solución técnica propuesta en la presente invención. El modelo experimental en cuestión, comprende la obtención y desarrollo de un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor murino del EGF, así como la caracterización del efecto biológico de dicho anticuerpo sobre líneas celulares murinas.
- 10

Evaluación del efecto anti-metastásico del tratamiento con AcM anti-EGFR.

Se usan ratones de las cepas Balb/c o C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad como modelo experimental para la evaluación del efecto anti-metastásico del tratamiento con AcM anti-EGFR.

- 15 Los ratones se tratan con un AcM específico para el dominio extracelular del EGFR murino o un AcM control (anticuerpo irrelevante para cada tumor, de igual isotipo que el AcM anti-EGFR) a dosis que oscilan entre 1 y 25 mg de AcM por Kg. de peso del ratón. Los AcMs se inoculan por vía intravenosa o intraperitoneal, y el esquema de inoculación puede realizarse de diversas maneras:
- 20
- Comenzar un día antes de la inoculación tumoral y mantenerse en los días 1, 2 y 3 luego del reto con el tumor y luego cada 3 días comenzando el día 6, hasta el final del ensayo.
 - Comenzar el día 2 luego de la inoculación tumoral, continuar el día 3 y luego cada 3 días comenzando el día 6, hasta el final del ensayo.
- 25
- Comenzar el día 6 luego de la inoculación tumoral y continuar cada 3 días, hasta el final del ensayo.

- A los ratones se les inoculan las células tumorales murinas que expresan el EGFR (provenientes de tumores de localizaciones tales como: pulmón, mama, colon, próstata, glioma, vejiga, cabeza y cuello) el día 0 mediante inoculación de las mismas en un rango de 1×10^3 a 1×10^6 células tumorales por ratón, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, para obtener metástasis en órganos como pulmón e hígado. Los animales se sacrifican por dislocación cervical entre los días 20 y 45 luego de la inoculación tumoral, y las metástasis para cada órgano individual se cuentan utilizando un microscopio estereoscópico.
- 30

- 35 **Medición del papel de las células T CD8⁺ sobre el efecto anti-metastásico del AcM anti-EGFR.**

- Se inoculan ratones con la línea tumoral en las mismas condiciones con que se hizo el experimento anti-metastásico anteriormente descrito y entre los días -1 y 6 con respecto al día de inoculación de las células tumorales (día 0), los ratones reciben una dosis que oscila entre 5 y 50 mg de AcM por Kg. de peso del ratón por vía intravenosa o intraperitoneal de un AcM específico por la molécula CD8⁺ que es capaz de eliminar las células que contengan este marcador. La administración de este AcM se realiza cada 4 días hasta el final del ensayo. Además se tratan los animales con el AcM anti-EGFR como se describe previamente. Los animales se sacrifican por dislocación cervical entre los días 20 y 45 luego de la inoculación tumoral, y las metástasis para cada órgano individual se cuentan utilizando un microscopio estereoscópico.

Evaluación del efecto anti-metastásico de la combinación del INF- α y AcM anti-EGFR.

- Se inoculan ratones con la línea tumoral en las mismas condiciones con que se hizo el experimento anti-metastásico anteriormente descrito, los cuales se tratan con un AcM específico para el dominio extracelular del EGFR murino a las dosis y vías ya descritas e INF- α murino a dosis que oscilan entre 5×10^5 y 5×10^6 unidades por Kg. de peso del ratón por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. El esquema de inoculación puede realizarse de diversas maneras: (a) de manera simultánea ambas terapias, (b) realizar un pre-tratamiento con el INF- α y luego administrar el AcM anti-EGFR o (c) realizar un pre-tratamiento con el INF- α y luego administrar la composición farmacéutica que contiene ambas moléculas. Los animales se sacrifican por dislocación cervical entre los días 20 y 45 luego de la inoculación tumoral, y las metástasis para cada órgano individual se cuentan utilizando un microscopio estereoscópico.

- 25 Composición inmunoterapéutica que comprende la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor humano del EGF, junto con INF- α .**

- Se administrará al paciente, inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico un tratamiento de inmunoterapia pasiva con un AcM específico contra el dominio extracelular del EGFR humano, conjuntamente con un tratamiento con INF- α que provoquen una respuesta de células T CD8⁺ en los individuos tratados.

La administración de una composición terapéutica que comprende un anticuerpo contra el EGF-R e INF- α , provoca un efecto sinérgico, logrando inhibir la aparición de metástasis en pacientes de cáncer.

- 35** El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, AcMs anti-EGFR en un rango de dosis de 100-400 mg más INF- α humano en un rango de dosis de $10 - 30 \times 10^6$ UI/ m²/día. Los protocolos de administración pueden seguir diversos esquemas. Preferiblemente la composición

- farmacéutica de la presente invención se puede administrar siguiendo uno de los siguientes esquemas: (a) la composición se administra mensualmente durante una semana o (b) cuatro semanas consecutivas cada tres meses. El tratamiento se administrará hasta regresión total o parcial del tumor primario o ante cualquier
- 5 reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Obtención de un AcM anti-EGFR murino.

- Ratones de la línea Balb/c se inmunizaron con una proteína recombinante que contiene el dominio extracelular del EGFR murino (*Sánchez B y cols. Int J Cancer 2006;120 en imprenta*) en adyuvante de Freund y los sueros se procesaron los días 0
- 10 y 60. La presencia de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante se midió mediante la técnica de ELISA. Todos los ratones desarrollaron respuesta de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante, alcanzando valores de títulos en un rango de 1:80 000 a 1:100 000.
- 15 Para la realización del experimento de fusión se seleccionó un ratón con alto título de anticuerpos séricos contra la proteína recombinante. Se obtuvo un AcM específico para el dominio extracelular del EGFR murino, el anticuerpo 7A7 (IgG1) (*Garrido G y cols. Hybridoma and Hybridomics 2004; 23 (3): 168-175*). Este anticuerpo reconoce específicamente las células murinas EGFR positivas mediante diferentes técnicas,
- 20 tales como: "Western Blot", FACS e Inmunohistoquímica.

- Las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de la región variable de la cadena pesada del AcM 7A7 (número de acceso del GenBank: DQ437656) se muestran en la Figura 1. Las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de la
- región variable de la cadena ligera (V_κ) del AcM 7A7 mAb (número de acceso del
- 25 GenBank: DQ437657) se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 2: Efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122.

- 2,5 x 10⁵ células del clon D122, del carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), se administraron a los ratones C57BL/6 (10 ratones por grupo) por la vía intravenosa por la vena de la cola. Seis días después comenzó el esquema de administración con los
- 30 AcMs (7A7 y control) a dosis de 2.8 mg de anticuerpo por Kg. de peso del ratón, por vía endovenosa en 100 µl de SSFT (solución salina tamponada con fosfato). Luego de 21 días de experimentación, los ratones fueron sacrificados y se contaron las metástasis pulmonares.
- La administración del AcM 7A7 redujo dramáticamente el número de metástasis pulmonares de D122 cuando se compara con los ratones tratados con el AcM control (Figura 3). La diferencia en el número de metástasis entre ambos grupos
- 35

experimentales fue estadísticamente significativa según la prueba de la U de Mann-Whitney realizada ($p < 0.0001$).

Ejemplo 3: El efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122 depende de las células T CD8⁺.

- 5
- 2,5 x 10⁵ células D122 se administraron a los ratones C57BL/6 (10 ratones por grupo) por la vía intravenosa por la vena de la cola. Seis días después comenzó el esquema de administración con los AcMs (7A7 y control) a dosis de 2.8 mg de anticuerpo por Kg. de peso del ratón, por vía endovenosa en 100 µl de SSFT. Los anticuerpos responsables de eliminar la población celular CD8⁺ fueron administrados a los ratones
- 10
- por vía intraperitoneal el mismo día que comenzó el régimen de tratamiento con el AcM 7A7 o control, manteniéndose su administración durante todo el ensayo. La efectividad de la eliminación celular fue verificada en el bazo y pulmón de los ratones. Luego de 21 días de experimentación, los ratones fueron sacrificados y se contaron las metástasis pulmonares.
- 15
- En este experimento, se verifica el efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122, observándose una significativa reducción en la mediana del número de metástasis pulmonares de D122 en el grupo de animales tratados con 7A7, cuando se compara con el grupo que recibió el AcM control (Figura 4 y Tabla 1), disminución que se hace estadísticamente significativa ($p < 0.01$, Prueba de Dunn). La eliminación de las
- 20
- células CD8⁺ aboga el efecto anti-metastásico del AcM 7A7, obteniéndose incluso un valor de mediana del número de metástasis pulmonares de D122 para este grupo de tratamiento, superior a la del grupo de ratones tratados con SSFT y que recibieron el anticuerpo específico por CD8 ($p > 0.05$, Prueba de Dunn) (Figura 4 y Tabla 1).

Mediana			
AcM 7A7	AcM control	AcM 7A7 + depleción	AcM control + depleción
7	44	49	44

25

Tabla 1. Mediana del número de metástasis de los grupos de experimentación.

Ejemplo 4: Incremento de los niveles de MHC-I por tratamiento con INF- α en las células D122 y MB16F10.

- 30
- Las células D122 y MB16F10 (0.25 x 10⁶ en placa de 6 pozos) se trataron con 1000 unidades/mL de INF- α durante 12 horas. Posteriormente, el nivel de expresión de

- MHC-I en la membrana de las células se determinó en las células sin tratamiento y en las células tratadas, usando Citometría de Flujo como se describe a continuación. Para minimizar las uniones inespecíficas, 2×10^5 células se incubaron durante 15 minutos a 4°C en SSTF con azida sódica (0.01%) [v:v] y BSA al 1% [p:v] (Solución B). Luego se
- 5 añadió un anticuerpo que reconoce la molécula H-2k^b de ratón conjugada a FITC (dilución 1:200) (Pharmingen, EEUU). Una vez marcadas y lavadas extensivamente, 10^4 células como mínimo se adquirieron usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, EEUU). Los datos obtenidos, se analizaron usando el programa WinMDI versión 2.8.
- 10 La adición del INF- α a las células D122 y MB16f10 provocó un incremento de las células que expresan el MHC I en membrana y también del nivel de expresión de este marcador en la superficie celular (Figura 5).

Ejemplo 5: Efecto del INF- α sobre la expresión del EGFR en las células D122.

- Las células D122 (0.25×10^6 en placa de 6 pozos) se trataron con 1000 unidades/mL de INF- α durante 48 horas. Posteriormente, el nivel de expresión de EGFR en la
- 15 membrana de las células se determinó en las células sin tratamiento y en las células tratadas, usando Citometría de Flujo como se describe a continuación. Para minimizar las uniones inespecíficas, 2×10^5 células se incubaron durante 15 minutos a 4°C en SSTF con azida sódica (0.01%) [v:v] y BSA al 1% [p:v] (Solución B). Luego se añadió
- 20 el AcM 7A7 a una concentración de 1 μ g/mL en la solución B y se incubaron igualmente 15 minutos a 4°C; después de este tiempo se realizaron lavados con la solución B. Posteriormente se añadió el suero de conejo anti-Igs totales de ratón conjugado a FITC (Pharmingen, EEUU), a una dilución 1:200 en la misma solución. Una vez marcadas y lavadas extensivamente, 10^4 células como mínimo se adquirieron
- 25 usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, EEUU). Los datos obtenidos, se analizaron usando el programa WinMDI versión 2.8.

La adición del INF- α a las células D122 no varió la expresión del EGFR en la membrana (Figura 6).

- Ejemplo 6: Efecto anti-metastásico de la combinación del AcM 7A7 con INF- α sobre el tumor D122.**
- 30

- 2,5 $\times 10^5$ células D122 se administraron a los ratones C57BL/6 (10 ratones por grupo) por la vía intravenosa por la vena de la cola. Seis días después comenzó la administración conjunta del INF- α (5 $\times 10^5$ unidades por Kg. de peso del ratón, vía intraperitoneal) y del AcM 7A7 (2.8 mg de anticuerpo por Kg. de peso del ratón, vía
- 35 intravenosa) que continuó tres veces por semana durante todo el ensayo. Luego de 21 días de experimentación, los ratones fueron sacrificados y se contaron las metástasis pulmonares. Los grupos de ratones que recibieron de manera independiente SSFT, AcM 7A7 e IFN- α fueron usados como control.

En este experimento, se verifica el efecto anti-metastásico del AcM 7A7 y el IFN- α sobre el tumor D122 (como monoterapia), observándose una reducción en el número de metástasis pulmonares de D122 en estos grupos, cuando se compara con el grupo que recibió el SSFT (Ver Figura 7/Tabla 2). Sin embargo, este efecto anti-metastásico se incrementa significativamente cuando los ratones reciben la terapia combinada (Ver Figura 7/Tabla 2) (SSFT vs. AcM 7A7+IFN- α : $p < 0,001$; AcM 7A7 vs AcM 7A7+IFN- α : $p < 0,05$; IFN- α vs AcM 7A7+IFN- α : $p < 0,05$, Prueba de Dunn).

Mediana			
SSFT	AcM 7A7	IFN- α	AcM 7A7+IFN- α
103	42	36	2

Tabla 2. Mediana del número de metástasis de los grupos de experimentación.

10 Breve descripción de las figuras:

Figura 1: Secuencias nucleotídica y aminoácida deducida del ADNc que codifica para la VH 7A7. Los aminoácidos se numeraron de acuerdo a Kabat. Se introdujeron espacios para maximizar las alineaciones. Los residuos aminoácidos codificados por cada codón se muestran encima de la secuencia nucleotídica.

15 **Figura 2:** Secuencias nucleotídica y aminoácida deducida del ADNc que codifica para la VK 7A7. Los aminoácidos se numeraron de acuerdo a Kabat. Se introdujeron espacios para maximizar las alineaciones. Los residuos aminoácidos codificados por cada codón se muestran encima de la secuencia nucleotídica.

20 **Figura 3:** Efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122. Los ratones C57BL/6 se inocularon con células D122 en un modelo de metástasis experimental y se trataron con el AcM 7A7 o un AcM control. Los animales fueron sacrificados al final del ensayo, y el número de metástasis pulmonares fue contado para cada ratón individual.

25 **Figura 4:** El efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122 depende de las células T CD8⁺.

30 Los ratones C57BL/6 se inocularon con células D122 en un modelo de metástasis experimental y se trataron con el AcM 7A7 o un AcM control. Conjuntamente en los ratones la población celular CD8⁺ fue eliminada por administración de un anticuerpo específico para dicha población. Los animales fueron sacrificados al final del ensayo, y el número de metástasis pulmonares fue contado para cada ratón individual.

Figura 5: Incremento de expresión de MHC-I por tratamiento con INF- α en las células D122 y MB16F10.

Las células D122 y MB16F10 se cultivaron durante 12 horas con INF- α . Finalmente, las células fueron incubadas con un AcM que reconoce el H-2k^b conjugado a FITC. El
5 por ciento de células positivas para este marcador fue medido por citómetro de flujo.

Figura 6: El tratamiento con el INF- α no varía la expresión del EGFR en las células D122.

Las células D122 se cultivaron durante 48 horas con INF- α . Finalmente, las células fueron incubadas con el AcM 7A7 para analizar la expresión del EGFR por citometría
10 de flujo.

Figura 7. El efecto anti-metastásico del tratamiento combinado del AcM 7A7 y el IFN- α es superior al de los tratamientos independientes. Los ratones C57BL/6 se inocularon con células D122 en un modelo de metástasis experimental y se trataron con el AcM 7A7 y el INF- α . Los animales fueron sacrificados al final del ensayo, y el número de
15 metástasis pulmonares fue contado para cada ratón individual.

20

25

30

35

Reivindicaciones:

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
1. Una composición terapéutica útil en el tratamiento del cáncer caracterizada porque comprende la administración simultánea o secuencial de un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más interferones del tipo 1.
 2. La composición terapéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque comprende un anticuerpo contra el receptor del EGF, interferon y un excipiente adecuado para su administración por vía intravenosa.
 3. La composición terapéutica de las reivindicaciones 1y 2, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo quimérico.
 4. La composición terapéutica de la reivindicación 3 caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo humanizado.
 5. La composición terapéutica de la reivindicación 4 caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es el anticuerpo humanizado hR3 producido por la línea celular con numero de deposito 951110101.
 6. La composición terapéutica de la reivindicación 1 y 2 caracterizada porque el interferon es de tipo 1.
 7. La composición terapéutica de la reivindicación 6 caracterizada porque el interferon es INF- α humano.
 8. La composición terapéutica de la reivindicación 7 caracterizada porque el interferon es INF- α humano recombinante.

9. Una composición terapéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo monoclonal HR3 contra el receptor de EGF producido por la línea celular con no. de Depósito 951110101 y el interferón INF- α humano recombinante.
- 5 10. La composición terapéutica de las reivindicaciones de la 1 a la 9 caracterizada porque la administración del anticuerpo y el INF es secuencial.
- 10 11. Un juego de reactivos para uso terapéutico caracterizado porque comprende un vial conteniendo un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más viales adicionales que contienen uno o más interferones, todos en un excipiente apropiado, así como una etiqueta u otra instrucción para sus dosificaciones y su uso.

15

20

25

[illegible]

Figura 1

5

Figura 2

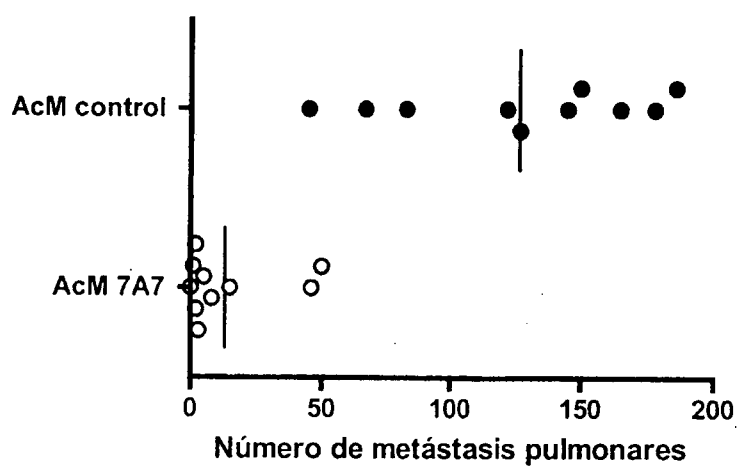


Figura 3

5

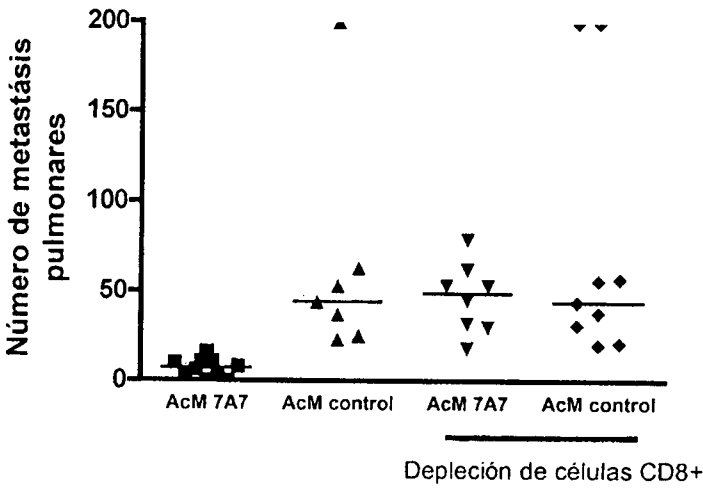


Figura 4

10

15

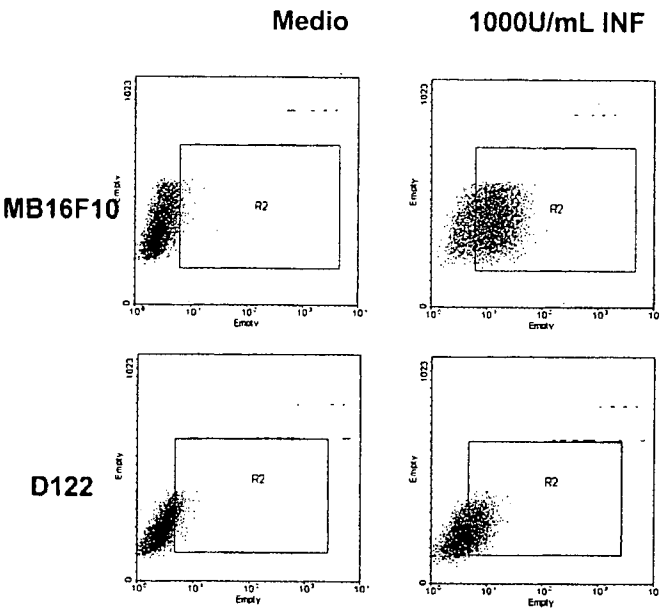


Figura 5

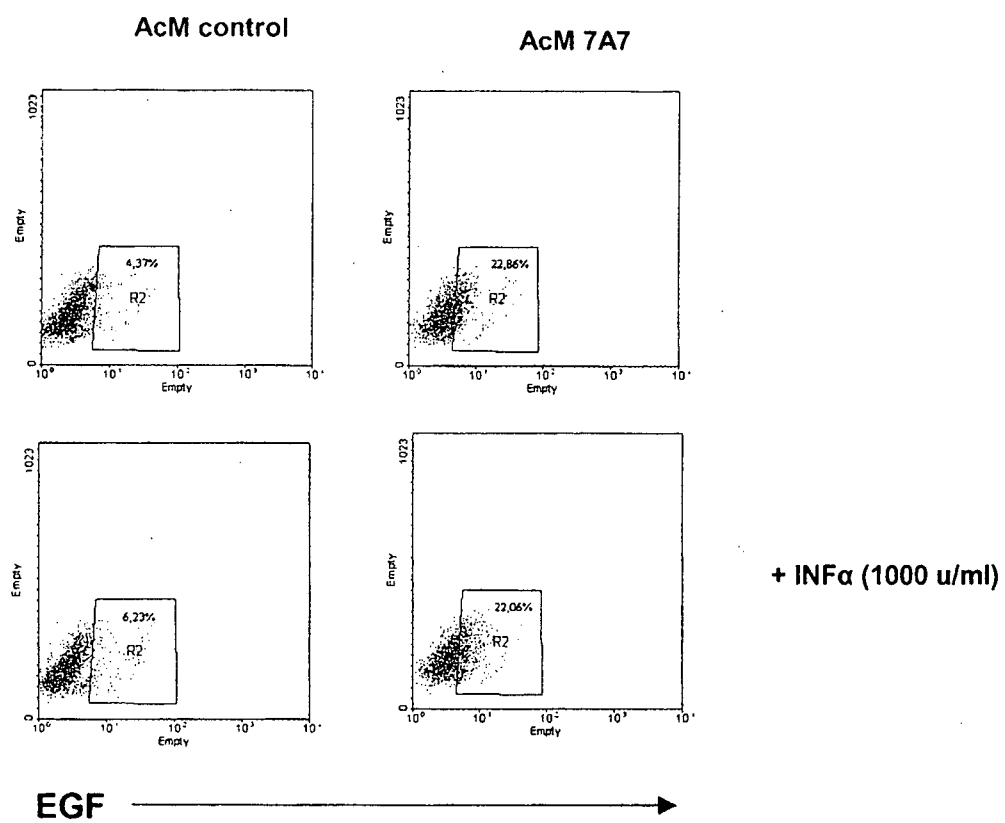


Figura 6

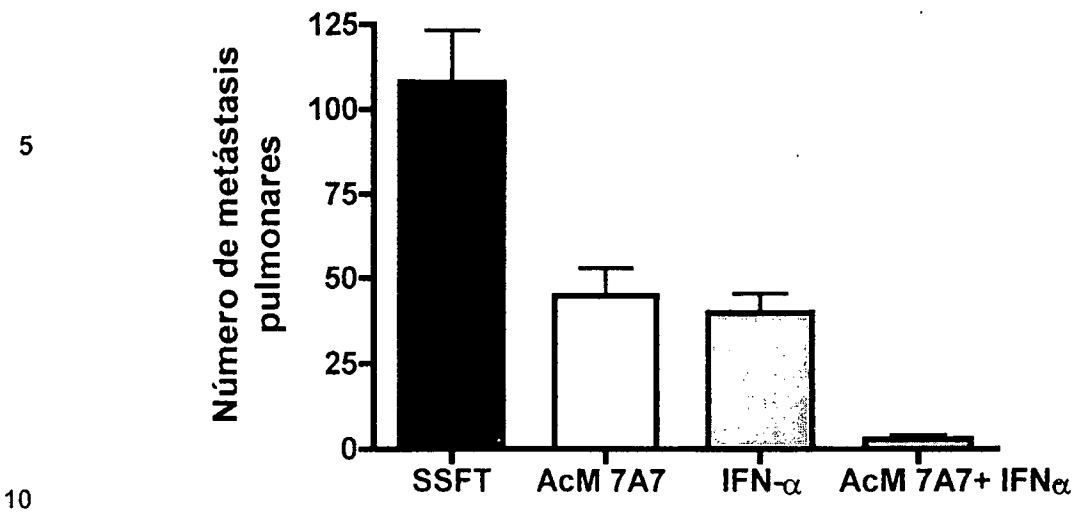


Figura 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ CU 2007/000017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/089842 A1 (MERCK PATENT GMBH) 14.11.2002, page 10, lines 9-15; page 16, line 5; claims 1 and 5.	1-11
Y	US 2006134064 A1 (GOLDSTEIN et al.) 22.06.2006, page 4, paragraphs 0034-0037	1-11
A	RAMOS, T.C. et al., "Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial.", CANCER BIOL. THER., 2006 Apr, Vol. 5, No. 4, pages 375-379. the whole document.	1-11
A	CROMBET, T. et al., "Use of the Humanized Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody h-R3 in Combination With Radiotherapy in the Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer Patients.", J. CLIN. ONCOL., 2004, Vol. 22, No 9, pages 1646-1654. the whole document.	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance. "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--	--

Date of the actual completion of the international search

25 January 2008 (25.01.2008)

Date of mailing of the international search report

(13/02/2008)

Name and mailing address of the ISA/

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J.L. Vizán Arroyo

Telephone No. +34 91 349 85 73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CU 2007/000017

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRUZZESE, F., et al., "Synergistic antitumor activity of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib and IFN-alpha in head and neck cancer cells in vitro and in vivo.", CLIN. CANCER RES., 2006 Jan, Vol.12, No. 2, pages 617-625. the whole document.	1-11
A	YANG, J.L. et al., "Interferon-alpha promotes the anti-proliferative effect of gefitinib (ZD 1839) on human colon cancer cell lines.", ONCOLOGY, 2005, Vol. 69, No. 3, pages 224-238. the whole document.	1-11
A	YANG, J.L. et al., " Interferon-alpha promotes the anti-proliferative effect of Erlotinib (OSI-774) on human colon cancer cell lines.", CANCER LETT., 2005, Vol. 225, No. 1, pages 61-74. the whole document.	1-11
A	CROMBET-RAMOS, T. et al., "Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: A humanized anti-EGFR antibody.", INT. J. CANCER, 2002, Vol. 101, No.6, pages 567-575. the whole document.	1-11
A	GRÜNWALD, V. et al., "Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment.", J. NATL. CANCER INST., 2003, Vol. 95, No. 12, pages 851-867. the whole document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ CU 2007/000017

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02089842 A	14.11.2002	CA 2449166 A	14.11.2002
		EP 1385546 A	04.02.2004
		EP 20020740492	22.04.2002
		HU 0303976 A	01.03.2004
		SK 14632003 A	02.03.2004
		MXPA 03010121 A	10.03.2004
		BR 0209147 A	08.06.2004
		CN 1507355 A	23.06.2004
		US 2004131611 A	08.07.2004
		CZ 20033226 A	14.07.2004
		JP 2004528368 T	16.09.2004
		PL 363322 A	15.11.2004
		RU 2003134180 A	10.02.2005
		ZA 200309437 A	04.03.2005
		AU 2002315306 B	17.05.2007
		US 2007202101 A	30.08.2007
US 2006134064 A	22.06.2006	NONE	-----

International application No. PCT/ CU 2007/000017
--

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ CU 2007/000017

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	WO 02/089842 A1 (MERCK PATENT GMBH) 14.11.2002, página 10, líneas 9-15; página 16, línea 5; reivindicaciones 1 y 5.	1-11
Y	US 2006134064 A1 (GOLDSTEIN et al.) 22.06.2006, página 4, párrafos 0034-0037	1-11
A	RAMOS, T.C. et al., "Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial.", CANCER BIOL. THER., 2006 Apr, Vol. 5, No. 4, páginas 375-379. todo el documento.	1-11
A	CROMBET, T. et al., "Use of the Humanized Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody h-R3 in Combination With Radiotherapy in the Treatment of Locally Advanced Head and Neck Cancer Patients.", J. CLIN. ONCOL., 2004, Vol. 22, No 9, páginas 1646-1654. todo el documento.	1-11

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
25.Enero.2008 (25.01.2008)	13 de febrero de 2008 (13/02/2008)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
O.E.P.M.	J.L. Vizán Arroyo
Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.	
Nº de fax 34 91 3495304	Nº de teléfono +34 91 349 85 73

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Abril 2007)

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	BRUZZESE, F., et al., "Synergistic antitumor activity of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib and IFN-alpha in head and neck cancer cells in vitro and in vivo.", CLIN. CANCER RES., 2006 Jan, Vol.12, No. 2, páginas 617-625. todo el documento.	1-11
A	YANG, J.L. et al., "Interferon-alpha promotes the anti-proliferative effect of gefitinib (ZD 1839) on human colon cancer cell lines.", ONCOLOGY, 2005, Vol. 69, No. 3, páginas 224-238. todo el documento.	1-11
A	YANG, J.L. et al., " Interferon-alpha promotes the anti-proliferative effect of Erlotinib (OSI-774) on human colon cancer cell lines.", CANCER LETT., 2005, Vol. 225, No. 1, páginas 61-74. todo el documento.	1-11
A	CROMBET-RAMOS, T. et al., "Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: A humanized anti-EGFR antibody.", INT. J. CANCER, 2002, Vol. 101, No.6, páginas 567-575. todo el documento.	1-11
A	GRÜNWALD, V. et al., "Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment.", J. NATL. CANCER INST., 2003, Vol. 95, No. 12, páginas 851-867. todo el documento.	1-11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°
PCT/CU 2007/000017

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 02089842 A	14.11.2002	CA 2449166 A	14.11.2002
		EP 1385546 A	04.02.2004
		EP 20020740492	22.04.2002
		HU 0303976 A	01.03.2004
		SK 14632003 A	02.03.2004
		MXPA 03010121 A	10.03.2004
		BR 0209147 A	08.06.2004
		CN 1507355 A	23.06.2004
		US 2004131611 A	08.07.2004
		CZ 20033226 A	14.07.2004
		JP 2004528368 T	16.09.2004
		PL 363322 A	15.11.2004
		RU 2003134180 A	10.02.2005
		ZA 200309437 A	04.03.2005
		AU 2002315306 B	17.05.2007
		US 2007202101 A	30.08.2007
US 2006134064 A	22.06.2006	NINGUNO	-----

Solicitud internacional nº
PCT/ CU 2007/000017

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)

Composiciones terapéuticas para potenciar el efecto de la terapia con anticuerpos contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.

Sector técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la Biotecnología en particular con la inmunoterapia específica del cáncer. Basado en el efecto sinérgico que tiene sobre el crecimiento de las metástasis el uso combinado de los anticuerpos monoclonales contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (AcMs anti-EGFR) con Interferones (INFs) de tipo I. La presente invención ofrece una herramienta terapéutica que supera las limitaciones de las monoterapias contra el EGFR.

10 Técnica anterior

Anticuerpos monoclonales anti-EGFR

El EGFR y sus ligandos están expresados en todos los tipos celulares a excepción de las células de origen hematopoyético (*Carpenter G. Annu Rev Biochem 1987; 56:881-914*). La expresión incrementada de estas proteínas se ha detectado en la mayoría de los tumores humanos de origen epitelial (*Salomon DS y cols. Crit Rev Oncol Hematol 1995; 19:183-232*). Estudios pre-clínicos han demostrado que los lazos de activación autocrina y paracrina que involucran el EGFR y sus ligandos, regulan el crecimiento y la habilidad de las células tumorales para formar metástasis (*Verbeek BS y cols. FEBS Lett 1998; 425:145-50; O-Charoenrat P y cols. Int J Cancer 2000; 86:307-17; Radinsky R y cols. Clin Cancer Res 1995; 1:19-31*). Como resultado de estas observaciones, se han identificado un número de potentes y selectivos antagonistas de la señalización a través del EGFR, que se encuentran bajo investigaciones clínicas (*Pal SK, Pegram M. Anticancer Drugs 2005; 16:483-94*).

Actualmente, el AcM quimérico ICM-C225/Cetuximab representa la más exitosa terapia anti-EGFR, encontrándose en la vanguardia de los ensayos clínicos. Este AcM se une específicamente al subdominio III del dominio extracelular del EGFR humano que compite con el ligando y bloquea la activación del receptor, afectando el proceso de dimerización. También induce eficientemente la internalización y la degradación del EGFR (*Shiqing L y cols. Cancer Cell 2005; 7:301-11*). Además, M. Namura y colaboradores demostraron que el Cetuximab puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, siglas en ingles "antibody-dependent cellular cytotoxicity") a través de la activación de las células mononucleares de sangre periférica de humanos, sugiriendo que ésta puede ser otra vía de acción anti-tumoral de este anticuerpo (*Naramura M y cols. Cancer Immunol Immunother 1993; 37:343-9*). En estudios pre-clínicos usando el AcM Cetuximab, se ha obtenido una remisión completa de tumores xenogénicos EGFR-positivos (*Goldstein J y cols. J Immunol 1997; 158:872-9*).

Estudios clínicos de Fase I realizados con pacientes de tumores sólidos EGFR-positivos han demostrado que el tratamiento con Cetuximab es bien tolerado (Robert F y cols. *J Clin Oncol* 2001; 19:3234-43; Baselga J y cols. *J Clin Oncol* 2000; 18:904-14; Shin DM y cols. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1204-13). Los principales
 5 eventos adversos atribuidos a esta terapia han sido reacciones alérgicas y toxicidad en piel (Shin DM y cols. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1204-13). El Cetuximab ha sido recientemente aprobado por la agencia regulatoria para los alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA, del inglés "Food and Drug Administration") para su uso como monoterapia o en combinación con Irinotecan en pacientes de carcinoma colorectal
 10 metastásico con expresión detectable del EGFR (ImClone Systems, Erbitux (Cetuximab). *US Prescribing Information. ImClone System, 2004*). Adicionalmente, se encuentran en curso estudios clínicos de Fases II y III usando este anticuerpo en pacientes con carcinoma de páncreas (Xiong HQ y cols. *J Clin Oncol* 2004; 22:2610-6), cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC, del inglés "non small cell lung cancer") (Lynch TJ y cols. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; Rosell R y cols. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2004) y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN, del inglés "squamous cell carcinoma of the head and the neck") (Bonner JA y cols. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2004).

También está siendo evaluado el AcM humanizado h-R3/TheraCIM (Centro de
 20 Inmunología Molecular, CIM). Este AcM tiene una capacidad similar al anticuerpo murino original para inhibir la unión del EGF (EGF, del inglés "epidermal growth factor") al receptor (Mateo C y cols. *Immunotechnology* 1997; 3:71-81). En experimentos "in vitro" se ha visto que el h-R3/TheraCIM inhibe el crecimiento de las células A431 de forma similar al AcM Cetuximab. El tratamiento de animales atímicos
 25 con tumores xenogénicos EGFR-positivos con este anticuerpo resulta en la regresión completa de los tumores establecidos (Viloria-Petit A y cols. *Cancer Res* 2001; 61:5090-101). El h-R3/TheraCIM se encuentra actualmente registrado por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) de Cuba para su uso en pacientes con tumores avanzados de cabeza y cuello (Crombet T y cols. *J Clin Oncol* 2004; 22:1646-54). También se están realizando ensayos clínicos en otras localizaciones como son glioma, mama, próstata y pulmón, obteniéndose resultados alentadores (Crombet T, comunicación personal).

Otros AcMs específicos por el EGFR humano que presentan mecanismos similares de acción están actualmente bajo investigación clínica. Este es el caso del ABX-EGF, una
 35 IgG2 humana, que inhibe la activación dependiente de ligando del EGFR e impide el crecimiento de tumores xenogénicos EGFR-positivos (Yang X y cols. *Cancer Res* 1999; 59:1236-43). Recientemente fueron publicados resultados positivos de la evaluación de este anticuerpo en un ensayo clínico de Fase III en pacientes de cáncer colorectal (Tyagi P. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5:21-3), y están en curso varios
 40 ensayos clínicos de Fase II en pacientes con cáncer renal (Amato RJ. *Ann Oncol* 2005; 16:7-15) y NSCLC (Tiseo M y cols. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004;

4:139-48). También está siendo evaluado el AcM humanizado EMD 72 000 en un ensayo clínico en pacientes con tumores de páncreas (Graeven U y cols. *Br J Cancer* 2006; 94:1293-9). No obstante, el beneficio del tratamiento de los pacientes con cáncer metastásico con estos AcMs anti-EGFR es relativamente marginal, sobre todo en lo que se refiere a aumentar la sobrevida. El Erbitux aplicado en los pacientes de cáncer de colon metastático que son refractarios al tratamiento con Irinotecan, aunque permitió estabilizar la enfermedad unos pocos meses, no logró aumentar la sobrevida de estos pacientes (Cunningham D y cols. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 337-345). Es por esto que es necesario buscar combinaciones terapéuticas que permitan incrementar la eficacia de los AcM anti-EGFr.

Inducción de linfocitos T citotóxicos por terapia pasiva con AcMs

La "presentación cruzada" fue descrita por Michael Bevan 25 años atrás (Bevan MJ. *J Exp Med* 1976; 143: 1283-88), y consiste en la capacidad que tienen las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés "antigen-presenting cells") de activar linfocitos T citotóxicos (CTLs, del inglés "cytotoxic T lymphocytes") específicos por antígenos de células foráneas capturadas por estas y presentados en las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés "major histocompatibility complex") clase I. Se han identificado varios factores que promueven este tipo de presentación, entre estos se encuentran las proteínas de choque térmico (Suto R y Srivastava PK. *Science* 1995; 269: 1585-88), los exosomas (Wolfers J y cols. *Nature Medicine* 2001; 7: 297-303) y los complejos inmunes (Regnault A y cols. *J Exp Med* 1999; 189: 371-80). A su vez las células muertas por apoptosis o necrosis son una fuente muy atractiva de antígenos para la "presentación cruzada". La consecuencia inmunológica de la ingestión de material celular proveniente de apoptosis o necrosis es muy controversial (Russo V y cols. *PNAS* 2000; 97: 2185-90; Yrild BU y cols. *J Exp Med* 2000; 191: 613-21). En general, el material celular necrótico es considerado como inmunogénico, mientras la apoptosis ha estado asociada por mucho tiempo con el evento de tolerización. Sin embargo bajo ciertas condiciones la muerte celular apoptótica ha mostrado ser una atractiva fuente de antígenos para la presentación cruzada y la activación de CTLs por proveer las "señales de peligro" necesarias para la maduración de las APC (Lake RA y Robinson BWS. *Nature Reviews* 2005; 5: 397-405).

El C2B8 (Rituximab) es un AcM quimérico dirigido contra la molécula CD20 (Relf ME y cols. *Blood* 1994; 83: 435-45). Este agente es usado para el tratamiento de linfomas no-Hodgkin de células B, donde provoca una eficiente eliminación de las células B neoplásicas, alcanzándose respuestas objetivas en el 50% de los pacientes e intervalos libres de progresión de la enfermedad por encima de los 12 meses (Maloney DG. *Curr Opin Haematol* 1998; 5:237-43; Coiffier By cols. *Blood* 1998; 92:1927-32; Hainsworth JDy cols. *Blood* 2000; 95:3052-56). Múltiples estudios han indicado que el máximo de respuesta clínica y molecular con el Rituximab se alcanza varios meses

después de aplicado el tratamiento, sugiriendo que los mecanismos citolíticos a corto plazo tales como la apoptosis, la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, "complement-dependent cytotoxicity") y la ADCC no son los únicos involucrados. En experimentos "in vitro" el Rituximab promueve la lisis de las células de linfoma a través de alguno de los mecanismos antes mencionados y la fagocitosis de los productos de las células tumorales por las APC y su subsiguiente "presentación cruzada" para activar CTLs específicos por el tumor (Selenko N y cols. *J. Clin. Oncol* 2002; 3:124-130). Este posible "efecto vacunación" no ha sido totalmente constatado en los estudios clínicos, por lo que sin duda alguna son necesarios posteriores ensayos que den resultados más sólidos que puedan apoyar esta hipótesis.

Los Interferones tipo I (α/β) como terapia anti-tumoral

Los INFs tipo I (α/β) son agentes biológicos usados en la terapia de 2 tipos de cáncer principalmente: melanoma y carcinoma renal, (Agarwala SS y Kirkwood JM. *Semin. Surg. Oncol.* 1998; 14: 302-310; Vlock DR y cols. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 1996; 19:433-442; Kirkwood JM y cols. *Semin. Oncol.* 1997; 24: 16-23; Kirkwood JM y cols. *J Clin. Oncol* 1996; 14: 7-17). El INF- α fue la primera citocina producida por la tecnología del ADN recombinante y ha demostrado ser un importante agente regulador de la proliferación y diferenciación de las células tumorales (Hertzog y cols. *J Biol Chem* 1994; 269:14088-93); también se ha reportado su efecto en la inducción de apoptosis (Clemens MJ. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23:277-92) e inhibición de los procesos de angiogénesis (Sidky YA y cols. *Cancer Res* 1987; 47:5155-61). Además de la acción directa sobre las células tumorales, los INF- α/β ejercen una gran variedad de efectos sobre las células inmunes del hospedero que pueden también jugar un papel importante en la respuesta inmune anti-tumoral (Belardelli F. *APMIS.* 1995; 103:161-179). Sin embargo, los datos provenientes de la efectividad clínica del INF- α en la terapia de tumores sólidos son inconsistentes. De hecho, sólo pacientes con determinados tipos de tumores se benefician del tratamiento con esa citocina, mientras otros son parcial o totalmente resistentes a la misma.

Existen estudios del papel del INF- α en la regulación de la expresión del EGFR en células tumorales (Budillon A y cols. *Cancer Res* 1991; 51: 1294-9; Caraglia M y cols. *Int J Cancer* 1995; 4: 309-16; Heise H y cols. *Anti Cancer Drugs* 1995; 6:686-92; Scambia G y cols. *Int J Cancer* 1994; 58: 769-73; Yang JL y cols. *Gut* 2004; 53: 123-129; Qu XJ y cols. *J Urology* 2004; 172: 733-738). Basado en los reportes de que esta citocina incrementa la expresión y actividad del EGFR en algunos tumores, diferentes autores han estudiado "in vitro" la ventaja de combinar inhibidores de la actividad tirosina cinasa del EGFR con INF- α en estos escenarios, obteniendo una ventaja anti-tumoral de la terapia combinada (Yang JL y cols. *Oncology* 2005; 69: 224-238; Brúcese F y cols. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 617-625; Yang JL y cols. *Cancer Letters* 2005; 225: 61-74. Sin embargo estos resultados no pueden ser generalizados pues la acción del INF- α sobre la expresión del EGFR en células tumorales es muy variable

- (Scambia G y cols. Int J Cancer 1994; Yang JL y cols. Gut 2004; 53: 123-129; Qu XJ y cols. J Urology 2004; 172: 733-738), lo cual pudiera limitar la ventaja de este tipo de tratamiento sólo a determinados nichos de pacientes. Por otro lado se ha evidenciado que el INF- α puede incrementar la expresión de las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés "major histocompatibility complex") clase I en los tejidos normales (Cho HJ y cols. J Immunology 2002; 168: 4907-13; Lang KS y cols. Nature Medicine 2005; 11: 138-44). En cambio en esta invención se enseña como la aplicación de INF α a células tumorales en cultivo puede incrementar sustancialmente la expresión de las moléculas de MHC-I, a pesar de que los tumores desarrollan mecanismos de escape a la presión de los efectores inmunológicos, entre ellos la pérdida de la expresión de moléculas de MHC-I. Por estas razones pudiese ser mucho más ventajosa la combinación de esta citocina con AcMs anti-EGFR, lo que potencialmente pudiera inducir una respuesta CTL, efecto que hasta el momento no ha sido atribuido a la acción de ningún inhibidor de actividad tirosina cinasa.
- 15 La presente invención está basada en dos eventos biológicos no descritos ni sugeridos previamente. El primero muestra que la terapia basada en AcMs anti-EGFR depende centralmente de la movilización de CTLs, más particularmente que el efecto anti-metastásico de AcMs contra el EGFR depende directamente de la participación de células T CD8⁺. El segundo evidencia que la acción de los INFs de tipo 1 sobre las células tumorales incrementa considerablemente la expresión de las moléculas de MHC-I. La aplicación combinada de estas dos observaciones permite incrementar notablemente el efecto terapéutico contra el cáncer de los AcM anti-EGFR y de los INFs tipo 1.

25 **Descripción detallada de la invención.**

- La presente invención está relacionada con una composición terapéutica útil en el tratamiento del cáncer, caracterizada porque comprende la administración simultánea o secuencial de un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más INFs del tipo 1, donde el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo quimérico o la variante humanizada de dicho anticuerpo. Específicamente, la invención trata de la composición terapéutica que comprende el anticuerpo humanizado hR3 que reconoce el receptor humano del EGF y es producido por la línea celular con número de depósito 951110101.

- Por otra parte la composición terapéutica de la presente invención está relacionada con el uso de los INFs de tipo 1 y mas específicamente con INF- α humano y mas específicamente con el INF- α humano recombinante.

Adicionalmente, la presente invención se relaciona con la forma de administración de la composición terapéutica descrita, que puede ser de forma simultánea o secuencial.

En otro aspecto la presente invención se relaciona con un juego de reactivos que comprende un vial conteniendo un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más viales adicionales que contienen uno o más INFs así como una etiqueta u otra instrucción para sus dosificaciones y su uso.

- 5 Dado que por razones éticas es imposible la experimentación en humanos, la presente invención se relaciona además con un biomodelo experimental que permite demostrar en vivo la solución técnica propuesta en la presente invención. El modelo experimental en cuestión, comprende la obtención y desarrollo de un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor murino del EGF, así como la caracterización del efecto biológico
- 10 de dicho anticuerpo sobre líneas celulares murinas.

Evaluación del efecto anti-metastásico del tratamiento con AcM anti-EGFR.

Se usan ratones de las cepas Balb/c o C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad como modelo experimental para la evaluación del efecto anti-metastásico del tratamiento con AcM anti-EGFR.

- 15 Los ratones se tratan con un AcM específico para el dominio extracelular del EGFR murino o un AcM control (anticuerpo irrelevante para cada tumor, de igual isotipo que el AcM anti-EGFR) a dosis que oscilan entre 1 y 25 mg de AcM por Kg. de peso del ratón. Los AcMs se inoculan por vía intravenosa o intraperitoneal, y el esquema de inoculación puede realizarse de diversas maneras:
- 20
- Comenzar un día antes de la inoculación tumoral y mantenerse en los días 1, 2 y 3 luego del reto con el tumor y luego cada 3 días comenzando el día 6, hasta el final del ensayo.
 - Comenzar el día 2 luego de la inoculación tumoral, continuar el día 3 y luego cada 3 días comenzando el día 6, hasta el final del ensayo.
- 25
- Comenzar el día 6 luego de la inoculación tumoral y continuar cada 3 días, hasta el final del ensayo.

- A los ratones se les inoculan las células tumorales murinas que expresan el EGFR (provenientes de tumores de localizaciones tales como: pulmón, mama, colon, próstata, glioma, vejiga, cabeza y cuello) el día 0 mediante inoculación de las mismas
- 30 en un rango de 1×10^5 a 1×10^6 células tumorales por ratón, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, para obtener metástasis en órganos como pulmón e hígado. Los animales se sacrifican por dislocación cervical entre los días 20 y 45 luego de la inoculación tumoral, y las metástasis para cada órgano individual se cuentan utilizando un microscopio estereoscópico.

- 35 **Medición del papel de las células T CD8⁺ sobre el efecto anti-metastásico del AcM anti-EGFR.**

- Se inoculan ratones con la línea tumoral en las mismas condiciones con que se hizo el experimento anti-metastásico anteriormente descrito y entre los días -1 y 6 con respecto al día de inoculación de las células tumorales (día 0), los ratones reciben una dosis que oscila entre 5 y 50 mg de AcM por Kg. de peso del ratón por vía intravenosa o intraperitoneal de un AcM específico por la molécula CD8⁺ que es capaz de eliminar las células que contengan este marcador. La administración de este AcM se realiza cada 4 días hasta el final del ensayo. Además se tratan los animales con el AcM anti-EGFR como se describe previamente. Los animales se sacrifican por dislocación cervical entre los días 20 y 45 luego de la inoculación tumoral, y las metástasis para cada órgano individual se cuentan utilizando un microscopio estereoscópico.

Evaluación del efecto anti-metastásico de la combinación del INF- α y AcM anti-EGFR.

- Se inoculan ratones con la línea tumoral en las mismas condiciones con que se hizo el experimento anti-metastásico anteriormente descrito, los cuales se tratan con un AcM específico para el dominio extracelular del EGFR murino a las dosis y vías ya descritas e INF- α murino a dosis que oscilan entre 5×10^5 y 5×10^6 unidades por Kg. de peso del ratón por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. El esquema de inoculación puede realizarse de diversas maneras: (a) de manera simultánea ambas terapias, (b) realizar un pre-tratamiento con el INF- α y luego administrar el AcM anti-EGFR o (c) realizar un pre-tratamiento con el INF- α y luego administrar la composición farmacéutica que contiene ambas moléculas. Los animales se sacrifican por dislocación cervical entre los días 20 y 45 luego de la inoculación tumoral, y las metástasis para cada órgano individual se cuentan utilizando un microscopio estereoscópico.

- 25 Composición inmunoterapéutica que comprende la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor humano del EGF, junto con INF- α .**

- Se administrará al paciente, inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico un tratamiento de inmunoterapia pasiva con un AcM específico contra el dominio extracelular del EGFR humano, conjuntamente con un tratamiento con INF- α que provoquen una respuesta de células T CD8⁺ en los individuos tratados.

La administración de una composición terapéutica que comprende un anticuerpo contra el EGF-R e INF- α , provoca un efecto sinérgico, logrando inhibir la aparición de metástasis en pacientes de cáncer.

- 35** El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, AcMs anti-EGFR en un rango de dosis de 100-400 mg más INF- α humano en un rango de dosis de $10 - 30 \times 10^6$ UI/ m²/día. Los protocolos de administración pueden seguir diversos esquemas. Preferiblemente la composición

- farmacéutica de la presente invención se puede administrar siguiendo uno de los siguientes esquemas: (a) la composición se administra mensualmente durante una semana o (b) cuatro semanas consecutivas cada tres meses. El tratamiento se administrará hasta regresión total o parcial del tumor primario o ante cualquier
- 5 reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Obtención de un AcM anti-EGFR murino.

- Ratones de la línea Balb/c se inmunizaron con una proteína recombinante que contiene el dominio extracelular del EGFR murino (*Sánchez B y cols. Int J Cancer*
- 10 *2006;120 en imprenta*) en adyuvante de Freund y los sueros se procesaron los días 0 y 60. La presencia de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante se midió mediante la técnica de ELISA. Todos los ratones desarrollaron respuesta de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante, alcanzando valores de títulos en un rango de 1:80 000 a 1:100 000.

- 15 Para la realización del experimento de fusión se seleccionó un ratón con alto título de anticuerpos séricos contra la proteína recombinante. Se obtuvo un AcM específico para el dominio extracelular del EGFR murino, el anticuerpo 7A7 (IgG1) (*Garrido G y cols. Hybridoma and Hybridomics 2004; 23 (3): 168-175*). Este anticuerpo reconoce específicamente las células murinas EGFR positivas mediante diferentes técnicas,
- 20 tales como: "Western Blot", FACS e Inmunohistoquímica.

- Las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de la región variable de la cadena pesada del AcM 7A7 (número de acceso del GenBank: DQ437656) se muestran en la Figura 1. Las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida de la
- región variable de la cadena ligera (V_{κ}) del AcM 7A7 mAb (número de acceso del
- 25 GenBank: DQ437657) se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 2: Efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122.

- 2,5 x 10⁵ células del clon D122, del carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), se administraron a los ratones C57BL/6 (10 ratones por grupo) por la vía intravenosa por la vena de la cola. Seis días después comenzó el esquema de administración con los
- 30 AcMs (7A7 y control) a dosis de 2.8 mg de anticuerpo por Kg. de peso del ratón, por vía endovenosa en 100 μ l de SSFT (solución salina tamponada con fosfato). Luego de 21 días de experimentación, los ratones fueron sacrificados y se contaron las metástasis pulmonares.

- La administración del AcM 7A7 redujo dramáticamente el número de metástasis pulmonares de D122 cuando se compara con los ratones tratados con el AcM control
- 35 (Figura 3). La diferencia en el número de metástasis entre ambos grupos

experimentales fue estadísticamente significativa según la prueba de la U de Mann-Whitney realizada ($p < 0.0001$).

Ejemplo 3: El efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122 depende de las células T CD8⁺.

- 5
- 2,5 x 10⁵ células D122 se administraron a los ratones C57BL/6 (10 ratones por grupo) por la vía intravenosa por la vena de la cola. Seis días después comenzó el esquema de administración con los AcMs (7A7 y control) a dosis de 2.8 mg de anticuerpo por Kg. de peso del ratón, por vía endovenosa en 100 µl de SSFT. Los anticuerpos responsables de eliminar la población celular CD8⁺ fueron administrados a los ratones
- 10
- por vía intraperitoneal el mismo día que comenzó el régimen de tratamiento con el AcM 7A7 o control, manteniéndose su administración durante todo el ensayo. La efectividad de la eliminación celular fue verificada en el bazo y pulmón de los ratones. Luego de 21 días de experimentación, los ratones fueron sacrificados y se contaron las metástasis pulmonares.
- 15
- En este experimento, se verifica el efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122, observándose una significativa reducción en la mediana del número de metástasis pulmonares de D122 en el grupo de animales tratados con 7A7, cuando se compara con el grupo que recibió el AcM control (Figura 4 y Tabla 1), disminución que se hace estadísticamente significativa ($p < 0.01$, Prueba de Dunn). La eliminación de las
- 20
- células CD8⁺ abroga el efecto anti-metastásico del AcM 7A7, obteniéndose incluso un valor de mediana del número de metástasis pulmonares de D122 para este grupo de tratamiento, superior a la del grupo de ratones tratados con SSFT y que recibieron el anticuerpo específico por CD8 ($p > 0.05$, Prueba de Dunn) (Figura 4 y Tabla 1).

Mediana			
AcM 7A7	AcM control	AcM 7A7 + depleción	AcM control + depleción
7	44	49	44

25

Tabla 1. Mediana del número de metástasis de los grupos de experimentación.

Ejemplo 4: Incremento de los niveles de MHC-I por tratamiento con INF- α en las células D122 y MB16F10.

Las células D122 y MB16F10 (0.25 x 10⁶ en placa de 6 pozos) se trataron con 1000 unidades/mL de INF- α durante 12 horas. Posteriormente, el nivel de expresión de

30

- MHC-I en la membrana de las células se determinó en las células sin tratamiento y en las células tratadas, usando Citometría de Flujo como se describe a continuación. Para minimizar las uniones inespecíficas, 2×10^5 células se incubaron durante 15 minutos a 4°C en SSTF con azida sódica (0.01%) [v:v] y BSA al 1% [p:v] (Solución B). Luego se
- 5 añadió un anticuerpo que reconoce la molécula H-2k^b de ratón conjugada a FITC (dilución 1:200) (Pharmlngen, EEUU). Una vez marcadas y lavadas extensivamente, 10^4 células como mínimo se adquirieron usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, EEUU). Los datos obtenidos, se analizaron usando el programa WinMDI versión 2.8.
- 10 La adición del INF- α a las células D122 y MB16f10 provocó un incremento de las células que expresan el MHC I en membrana y también del nivel de expresión de este marcador en la superficie celular (Figura 5).

Ejemplo 5: Efecto del INF- α sobre la expresión del EGFR en las células D122.

- Las células D122 (0.25×10^6 en placa de 6 pozos) se trataron con 1000 unidades/mL de INF- α durante 48 horas. Posteriormente, el nivel de expresión de EGFR en la
- 15 membrana de las células se determinó en las células sin tratamiento y en las células tratadas, usando Citometría de Flujo como se describe a continuación. Para minimizar las uniones inespecíficas, 2×10^5 células se incubaron durante 15 minutos a 4°C en SSTF con azida sódica (0.01%) [v:v] y BSA al 1% [p:v] (Solución B). Luego se añadió
- 20 el AcM 7A7 a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ en la solución B y se incubaron igualmente 15 minutos a 4°C ; después de este tiempo se realizaron lavados con la solución B. Posteriormente se añadió el suero de conejo anti-Igs totales de ratón conjugado a FITC (Pharmlngen, EEUU), a una dilución 1:200 en la misma solución. Una vez marcadas y lavadas extensivamente, 10^4 células como mínimo se adquirieron
- 25 usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, EEUU). Los datos obtenidos, se analizaron usando el programa WinMDI versión 2.8.

La adición del INF- α a las células D122 no varió la expresión del EGFR en la membrana (Figura 6).

- Ejemplo 6: Efecto anti-metastásico de la combinación del AcM 7A7 con INF- α sobre el tumor D122.**
- 30

- 2.5×10^5 células D122 se administraron a los ratones C57BL/6 (10 ratones por grupo) por la vía intravenosa por la vena de la cola. Seis días después comenzó la administración conjunta del INF- α (5×10^5 unidades por Kg. de peso del ratón, vía intraperitoneal) y del AcM 7A7 (2.8 mg de anticuerpo por Kg. de peso del ratón, vía
- 35 intravenosa) que continuó tres veces por semana durante todo el ensayo. Luego de 21 días de experimentación, los ratones fueron sacrificados y se contaron las metástasis pulmonares. Los grupos de ratones que recibieron de manera independiente SSFT, AcM 7A7 e IFN- α fueron usados como control.

En este experimento, se verifica el efecto anti-metastásico del AcM 7A7 y el IFN- α sobre el tumor D122 (como monoterapia), observándose una reducción en el número de metástasis pulmonares de D122 en estos grupos, cuando se compara con el grupo que recibió el SSFT (Ver Figura 7/Tabla 2). Sin embargo, este efecto anti-metastásico se incrementa significativamente cuando los ratones reciben la terapia combinada (Ver Figura 7/Tabla 2) (SSFT vs. AcM 7A7+IFN- α : $p < 0,001$; AcM 7A7 vs AcM 7A7+IFN- α : $p < 0,05$, IFN- α vs AcM 7A7+IFN- α : $p < 0,05$, Prueba de Dunn).

Mediana			
SSFT	AcM 7A7	IFN- α	AcM 7A7+IFN- α
103	42	36	2

Tabla 2. Mediana del número de metástasis de los grupos de experimentación.

10 Breve descripción de las figuras:

Figura 1: Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc que codifica para la VH 7A7. Los aminoácidos se numeraron de acuerdo a Kabat. Se introdujeron espacios para maximizar las alineaciones. Los residuos aminoacídicos codificados por cada codón se muestran encima de la secuencia nucleotídica.

15 **Figura 2:** Secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc que codifica para la VK 7A7. Los aminoácidos se numeraron de acuerdo a Kabat. Se introdujeron espacios para maximizar las alineaciones. Los residuos aminoacídicos codificados por cada codón se muestran encima de la secuencia nucleotídica.

20 **Figura 3:** Efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122. Los ratones C57BL/6 se inocularon con células D122 en un modelo de metástasis experimental y se trataron con el AcM 7A7 o un AcM control. Los animales fueron sacrificados al final del ensayo, y el número de metástasis pulmonares fue contado para cada ratón individual.

25 **Figura 4:** El efecto anti-metastásico del AcM 7A7 sobre el tumor D122 depende de las células T CD8⁺.

Los ratones C57BL/6 se inocularon con células D122 en un modelo de metástasis experimental y se trataron con el AcM 7A7 o un AcM control. Conjuntamente en los ratones la población celular CD8⁺ fue eliminada por administración de un anticuerpo específico para dicha población. Los animales fueron sacrificados al final del ensayo, y el número de metástasis pulmonares fue contado para cada ratón individual.

30

Figura 5: Incremento de expresión de MHC-I por tratamiento con INF- α en las células D122 y MB16F10.

- Las células D122 y MB16F10 se cultivaron durante 12 horas con INF- α . Finalmente, las células fueron incubadas con un AcM que reconoce el H-2k^b conjugado a FITC. El
- 5 porcentaje de células positivas para este marcador fue medido por citómetro de flujo.

Figura 6: El tratamiento con el INF- α no varía la expresión del EGFR en las células D122.

- Las células D122 se cultivaron durante 48 horas con INF- α . Finalmente, las células fueron incubadas con el AcM 7A7 para analizar la expresión del EGFR por citometría
- 10 de flujo.

- Figura 7.** El efecto anti-metastásico del tratamiento combinado del AcM 7A7 y el IFN- α es superior al de los tratamientos independientes. Los ratones C57BL/6 se inocularon con células D122 en un modelo de metástasis experimental y se trataron con el AcM 7A7 y el INF- α . Los animales fueron sacrificados al final del ensayo, y el número de
- 15 metástasis pulmonares fue contado para cada ratón individual.

Reivindicaciones:

1. Una composición terapéutica útil en el tratamiento del cáncer caracterizada porque comprende la administración simultánea o secuencial de un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más interferones del tipo 1.
- 5 2. La composición terapéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque comprende un anticuerpo contra el receptor del EGF, interferon y un excipiente adecuado para su administración por vía intravenosa.
- 10 3. La composición terapéutica de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo quimérico.
- 15 4. La composición terapéutica de la reivindicación 3 caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo humanizado.
- 20 5. La composición terapéutica de la reivindicación 4 caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es el anticuerpo humanizado hR3 producido por la línea celular con numero de deposito 951110101.
6. La composición terapéutica de la reivindicación 1 y 2 caracterizada porque el interferon es de tipo 1.
- 25 7. La composición terapéutica de la reivindicación 6 caracterizada porque el interferon es INF- α humano.
8. La composición terapéutica de la reivindicación 7 caracterizada porque el interferon es INF- α humano recombinante.

9. Una composición terapéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo monoclonal HR3 contra el receptor de EGF producido por la línea celular con no. de Depósito 951110101 y el interferón INF- α humano recombinante.
- 5 10. La composición terapéutica de las reivindicaciones de la 1 a la 9 caracterizada porque la administración del anticuerpo y el INF es secuencial.
- 10 11. Un juego de reactivos para uso terapéutico caracterizado porque comprende un vial conteniendo un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más viales adicionales que contienen uno o más interferones, todos en un excipiente apropiado, así como una etiqueta u otra instrucción para sus dosificaciones y su uso.

3/7

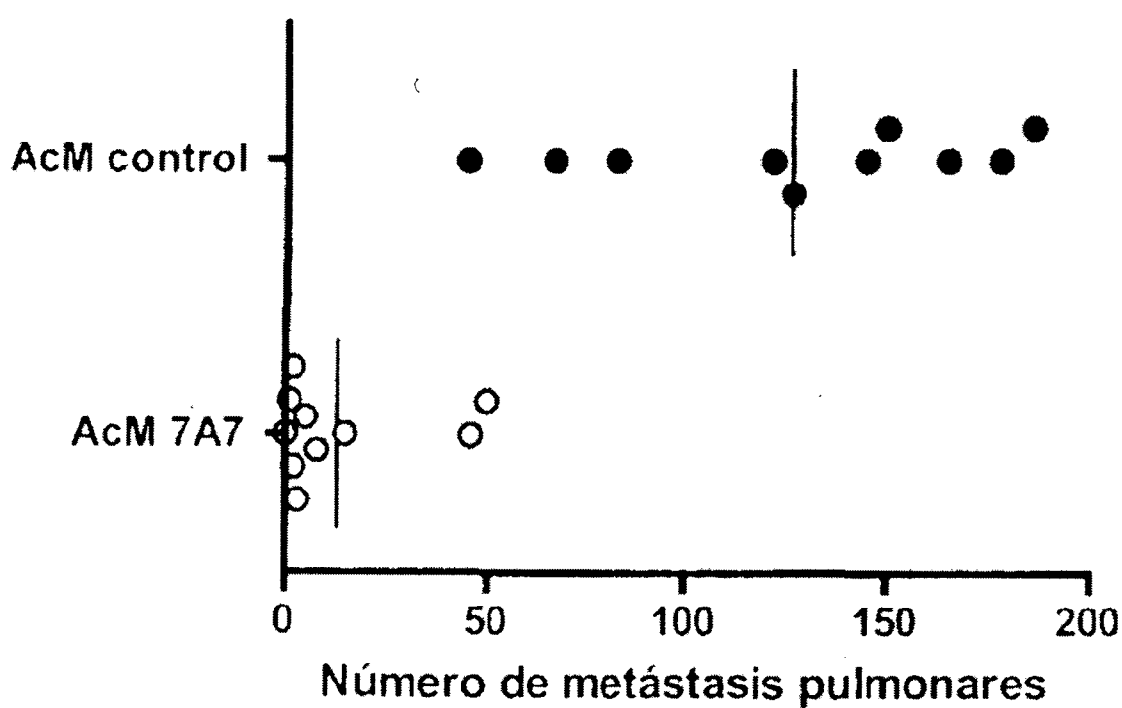


Figura 3

4/7

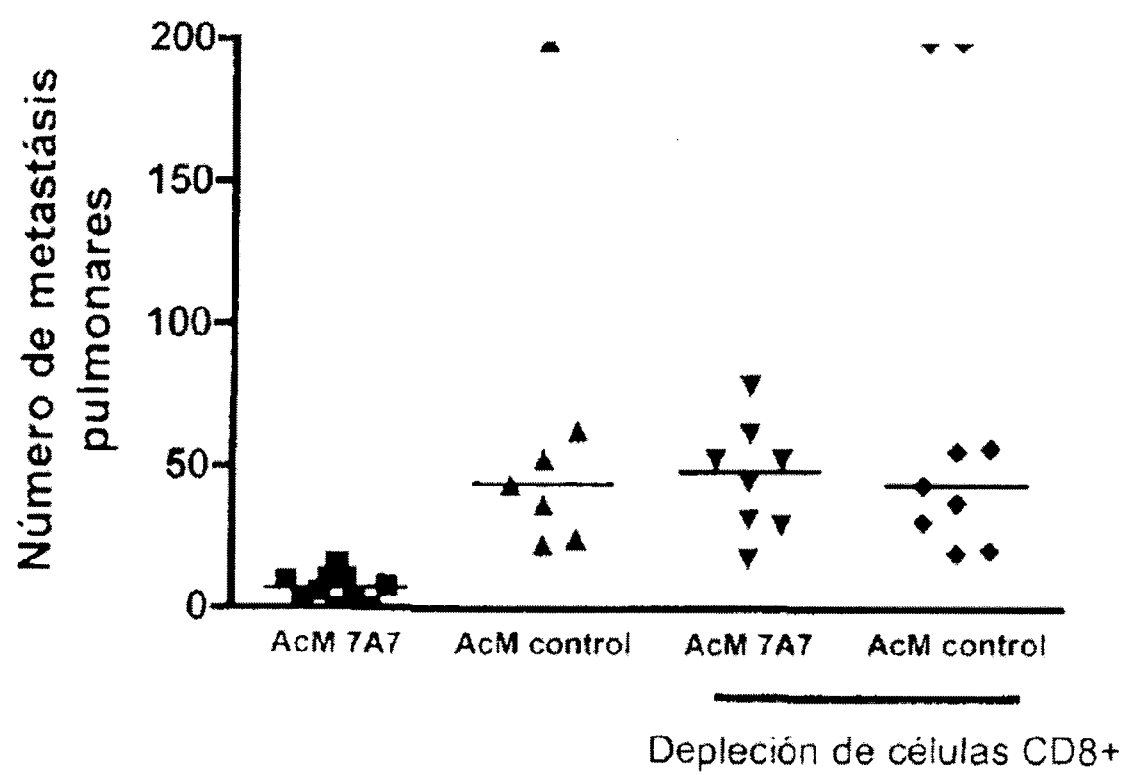


Figura 4

5/7

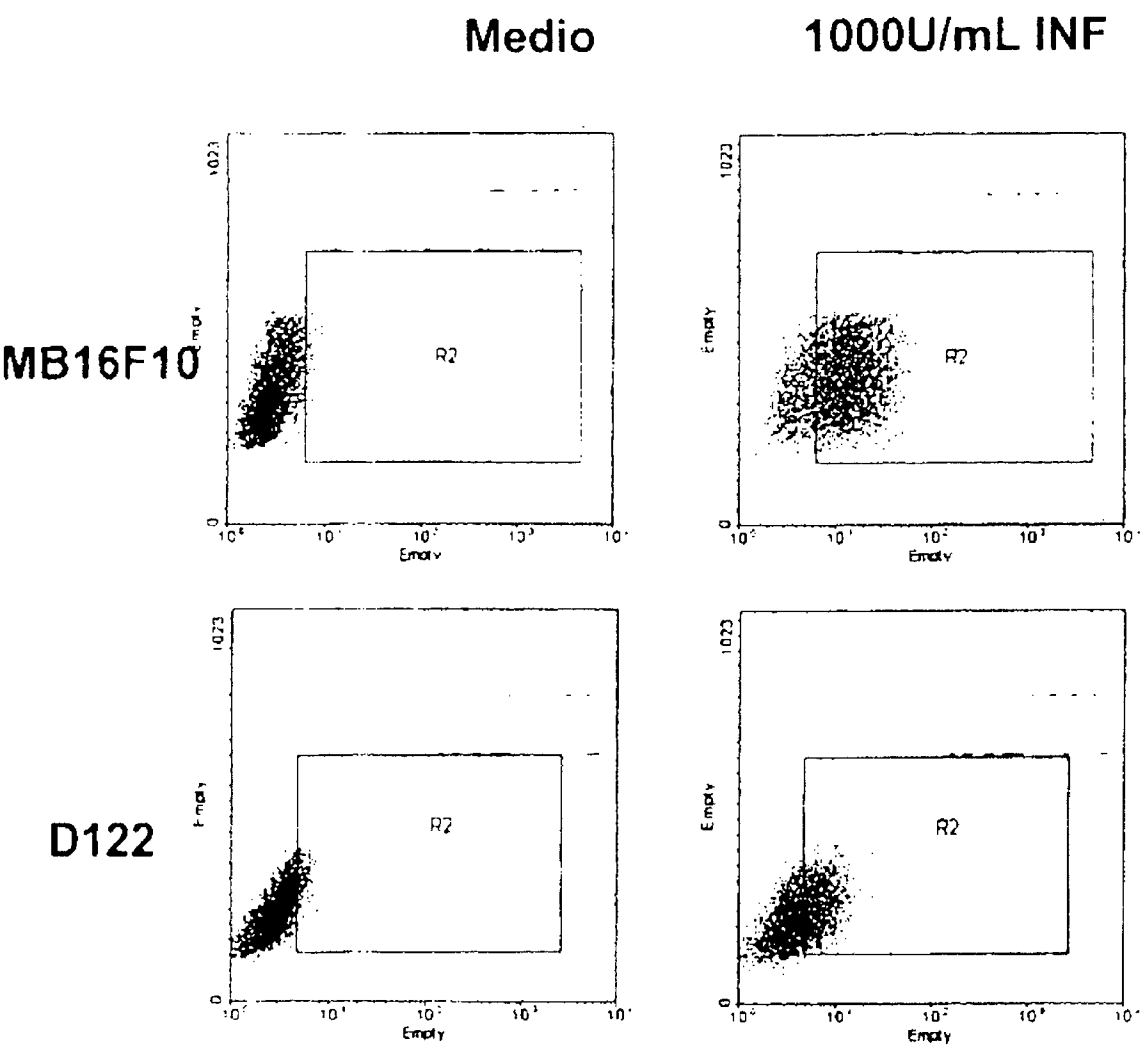
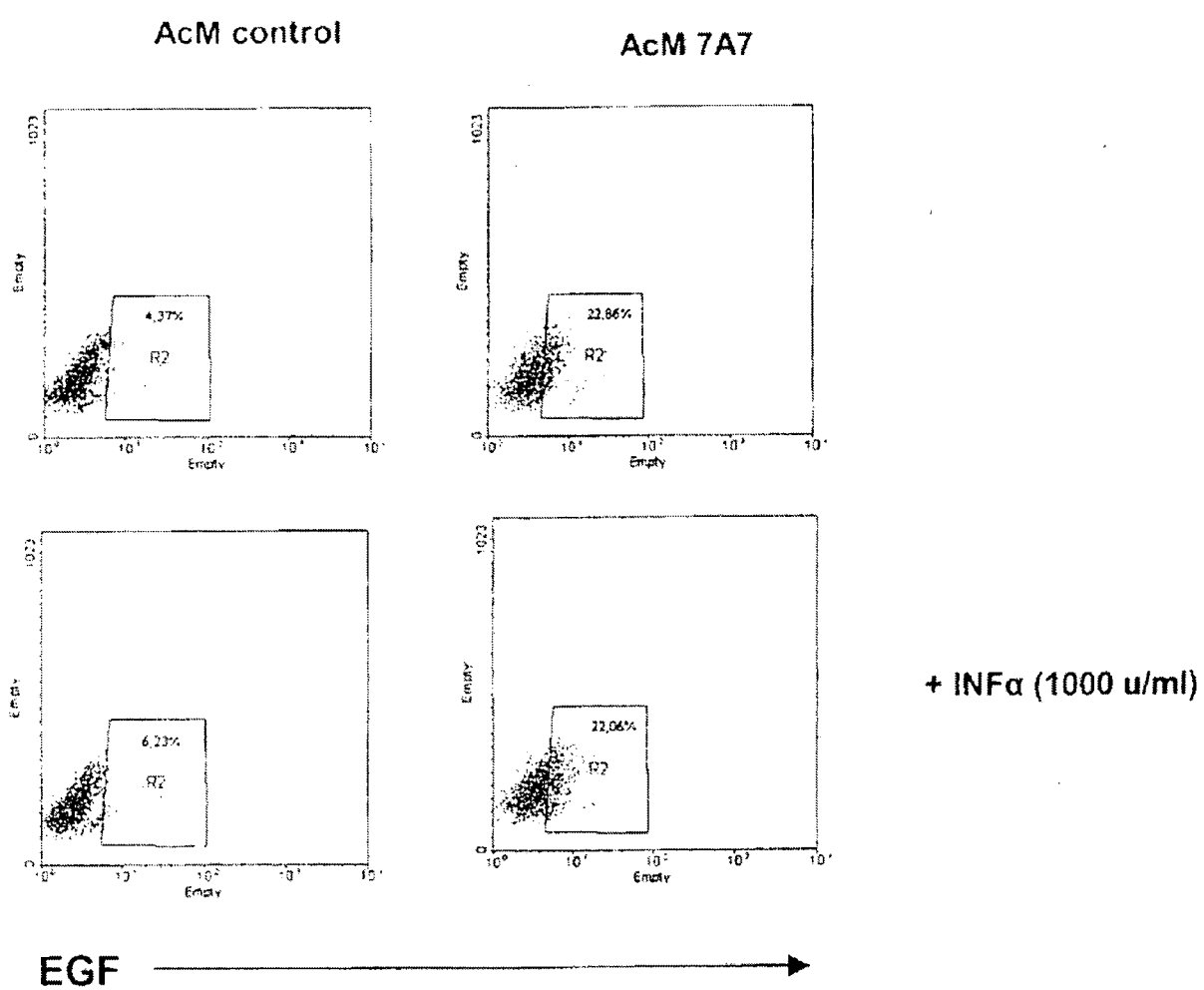


Figura 5

6/7



7/7

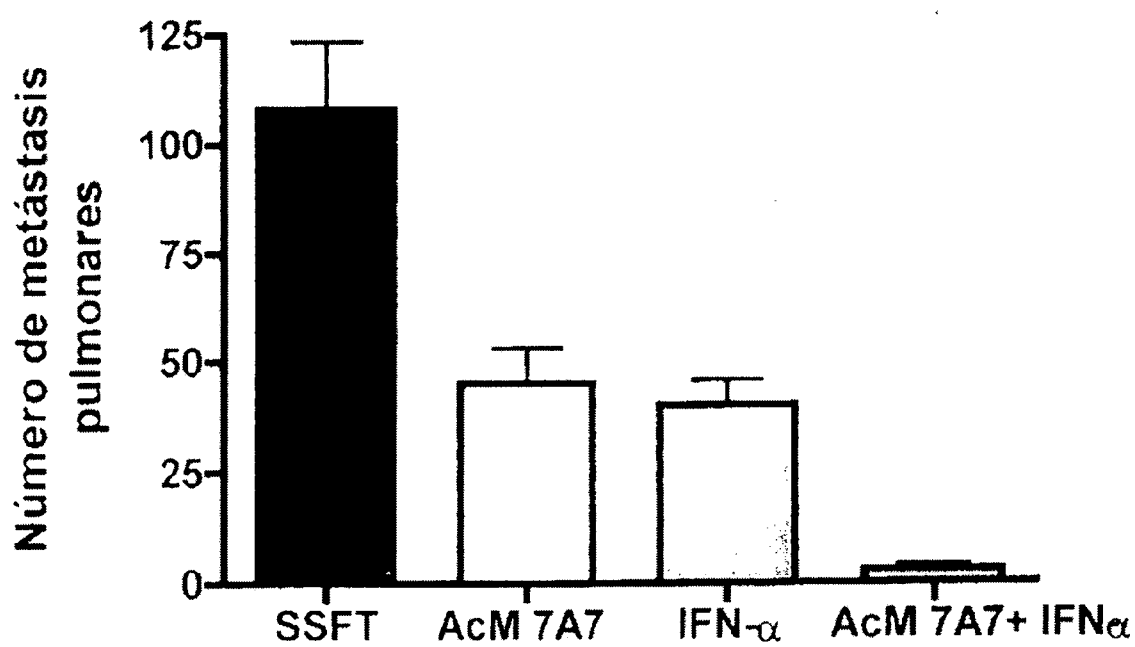


Figura 7



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**

(72) Inventor(es) **LUIS ENRIQUE FERNANDEZ MOLINA, GRETA GARRIDO HIDALGO, ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ, BELINDA SANCHEZ RAMIREZ, AUDRY FERNANDEZ GOMEZ, ALEJANDRO LOPEZ REQUENA, IRENE BEAUSOLEIL DELGADO**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad
190-2006

(32)

Fecha
29/09/2006

(33) País
CU

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **03/04/2008**

Fecha de presentación de la solicitud: **27/09/2007**

N° publicación: **WO 2008/037225 A1**

No. de solicitud **PCT/CU2007/000017**

(84) Título: **COMPOSICIONES TERAPEUTICAS PARA POTENCIAR EL EFECTO DE LA TERAPIA CON ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO**

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) N° Prioridad (32) Fecha (33) País 190-2006 29/09/2006 CU		(51) Int. Cl.: (71) Solicitante(s) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (72) Inventor(es) LUIS ENRIQUE FERNANDEZ MOLINA GRETA GARRIDO HIDALGO ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ Y OTROS (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 27/09/2007 N° de solicitud PCT/CU2007/000017		(87) Publicación internacional Fecha: 03/04/2008 N° publicación: WO 2008/037225 A1	
(54) Título: COMPOSICIONES TERAPEUTICAS PARA POTENCIAR EL EFECTO DE LA TERAPIA CON ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO			

Reivindicación(es):

1. Una composición terapéutica útil en el tratamiento del cáncer caracterizada porque comprende la administración simultánea o secuencial de un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más interferones del tipo 1.
2. La composición terapéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque comprende un anticuerpo contra el receptor del EGF, interferón y un excipiente adecuado para su administración por vía intravenosa.
3. La composición terapéutica de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo quimérico.
4. La composición terapéutica de la reivindicación 3, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es un anticuerpo humanizado.
5. La composición terapéutica de la reivindicación 4, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal contra el receptor del EGF es el anticuerpo humanizado HR3 producido por la línea celular con numero de deposito 951110101.
6. La composición terapéutica de la reivindicación 1 y 2 caracterizada porque el interferón es de tipo 1.
7. La composición terapéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque el interferón es INF- α humano.
8. La composición terapéutica de la reivindicación 7, caracterizada porque el interferón INF- α humano recombinante.
9. Una composición terapéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo monoclonal HR3 contra el receptor de EGF producido por la línea celular con No. de Depósito 951110101 y el interferón INF- α humano recombinante.
10. La composición terapéutica de las reivindicaciones de la 1 a la 9 caracterizada porque la administración del anticuerpo y el INF es secuencial.
11. Un juego de reactivos para uso terapéutico caracterizado porque comprende un vial conteniendo un anticuerpo contra el receptor del EGF y uno o más viales adicionales que contienen uno o más interferones, todos en un excipiente apropiado, así como una etiqueta u otra instrucción para sus dosificaciones y su uso.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Apoderado(a) y/o Representante de
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

REFERENCIA	Radicación No.	9 30399
	Solicitud internacional	PCT/CU2007/000017
	Fecha inicio fase nacional	29/04/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	-5118

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al capítulo I o II del PCT por que la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

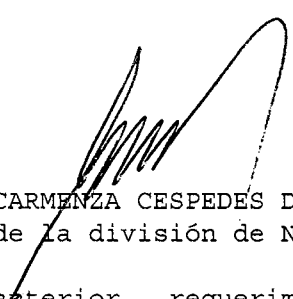
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 30399



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 02 MAYO 2009
jfernand