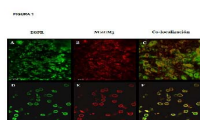


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES QUE EXPRESAN REGF Y GANGLIÓSIDO N-GLICOLIL GM3 (NeuGcGM3)			
2	Datos del Solicitante / Titular		
Nombre:	CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:	Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, La Habana 11600, CUBA	Domicilio/País de constitución:	CUBA - CIUDAD DE LA HABANA - LA HABANA
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT	

Número:		516861772484-	
3	Solicitantes		
Apellidos - Nombres o Razón Social		Tipo	Identificación
1.	CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR	NN	516861772484
4	Datos del Inventor		
Nombre:		Adys GONZÁLEZ PALOMO	Dirección Electrónica: sic@castellanosyco.co
Dirección:		Joaquín Delgado No. 412 e/. N. Gerona y S. Agustín, Arroyo Naranjo, La Habana, CUBA	Domicilio/País de constitución: CUBA - CIUDAD DE LA HABANA - LA HABANA
Identificación:			
☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT ☒ No Aplica			
Número:		-	
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1.	GONZÁLEZ PALOMO Adys	CUBA	
2.	CARR PEREZ Adriana	CUBA	
3.	LEÓN MONZÓN Kalet	CUBA	
4.	BLANCO SANTANA Rancés	CUBA	
5.	BARROSO ALVAREZ María del Carmen	CUBA	
6.	MACÍAS ABRAHAM Amparo Emilia	CUBA	

7. MONTERO CASIMIRO José Enrique CUBA

6

Datos Inventor(es)

País de Residencia

Departamento/Estado

Ciudad

Dirección

- | | | | | |
|----|------|---------------------|-----------|---|
| 1. | CUBA | CIUDAD DE LA HABANA | LA HABANA | Joaquín Delgado
No. 412 e/. N.
Gerona y S.
Agustín, Arroyo
Naranjo, La
Habana, CUBA |
| 2. | CUBA | CIUDAD DE LA HABANA | LA HABANA | Lacret No. 155 e/.
Heredia y Alcalde
O´Farril. Stos
Suarez, 10 de
Octubre, La
Habana, CUBA |
| 3. | CUBA | CIUDAD DE LA HABANA | LA HABANA | Calle: 31 No.
32009 e/. 320 y
322, Rpto Fraga,
La Lisa, La
Habana, CUBA |
| 4. | CUBA | CIUDAD DE LA HABANA | LA HABANA | Calle 180 Zaragoza
No. 189 e/ Calzada
del Cerro y Manila
Apto 4a, Apartado
Postal 10600, La
Habana, CUBA |
| 5. | CUBA | CIUDAD DE LA HABANA | LA HABANA | Calle 180 No. 4905
e/. 49 y 51,
Versalles, Lisa, La
Habana, CUBA |
| 6. | CUBA | CIUDAD DE LA HABANA | LA HABANA | Calle 10 No. 208
Apto 114 e/. Línea
y 11. Plaza, La
Habana. CUBA |
| 7. | CUBA | CIUDAD DE LA HABANA | LA HABANA | Calle 314 No. 2916
entre 29 y 31,
Fraga, La Lisa,
Habana, CUBA |

7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co
Dirección:		CALLE 94A 7A 09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT Número: 39779654-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/CU2012/000007	Fecha Solicitud:	04/12/2012
Número Publicacion:		WO 2013/097834	Fecha Publicacion:	04/07/2013
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen CUBA	Codigo del país CU	(31) No. Solicitud CU/P/2011/0245	(32) Fecha 27/12/2011
10	Reivindicaciones			
Número reivindicaciones:		23	Pago Reivindicaciones:	Si
11	Reducción de tasas.			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente. ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				

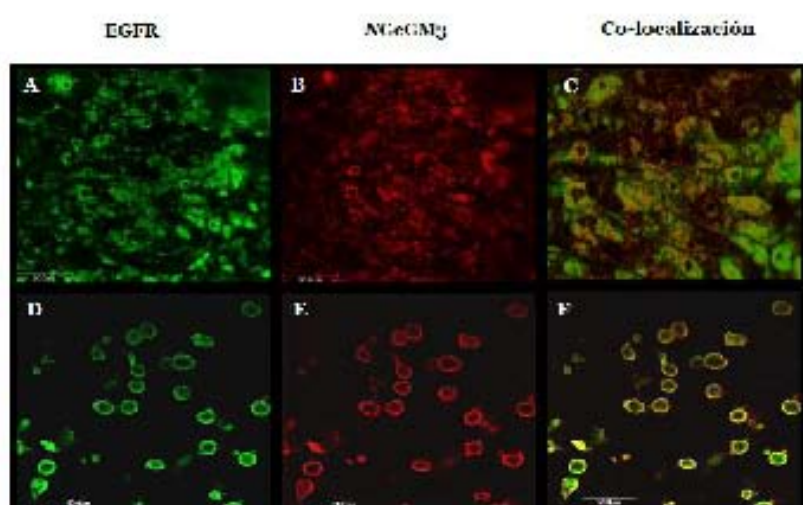
- ☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
- ☐ Universidades públicas o privadas
- ☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12	Documentos Anexos
-----------	--------------------------

- | | |
|--|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> ☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☐ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☐ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☒ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos |
|--|--|

FIGURA 1



COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES QUE EXPRESAN REGF Y GANGLIÓSIDO *N*-GLICOLIL GM3 (NeuGcGM3)

CAMPO DE LA TÉCNICA

- 5 Esta invención se relaciona con la rama de la medicina humana, y particularmente con el tratamiento de tumores que sobre-expresan REGF y gangliósido *N*-glicolil (NeuGcGM3).

ANTECEDENTES

- El receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF) es uno de los blancos
10 moleculares que más se usan en la evaluación clínica actual. Esta molécula se sobre-
expresa en una gran variedad de tejidos epiteliales humanos (Yarden, Y., and Sliwkowski
M. X., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001, 2: 127–137). Dos tratamientos son los más utilizados
en las terapias para la inhibición de la función del receptor de EGF: la neutralización por
15 anticuerpos monoclonales (AcMs) y las pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad
tirosina quinasa (TKI del inglés tirosin quinasa inhibitor) (Ciardiello, F., and Tortora G., N.
Engl. J. Med. 2008, 358: 1160–1174). Aunque también se ha demostrado que una vacuna
con el dominio extracelular del REGF al utilizar el VSSP como adyuvante generó efecto
anti-metastásico en el modelo murino de carcinoma pulmonar de Lewis (Sánchez Ramírez
B., y otros, Int. J. Cancer. 2006, 119: 2190-2199). Los tratamientos con anticuerpos
20 monoclonales anti-REGF median la regresión tumoral por la interrupción de señales
oncogénicas y la inducción de un mecanismo de respuesta inmune innata mediados por el
receptor de Fc (Martinelli, E., y otros, Clin. Exp. Immunol. 2009, 158: 1–9).

- Varios AcMs contra el REGF humano se han generado entre ellos: el Cetuximab (Garrett
CR, y Eng C., Expert Opin Biol Ther. 2011; 11: 7, 937-49) y el Nimotuzumab (Mateo C,
25 Immunotechnology 1997; 3:71-81). Se ha descrito el efecto antitumoral del Nimotuzumab
en la terapia de diferentes tumores que sobre-expresan el REGF (Crombet T, y otros,
Cancer Biol Therapy. 2006, 5:375–379) o combinado con otros tratamientos (Crombet T, y
otros, J Clin Oncol. 2004, 22:1646–1654; Zhao KL, y otros, Invest New Drugs. 2011 Pre
publicado on line Septiembre 8). Por otro lado, el AcM 7 A 7 generado contra el REGF
30 murino demostró efecto antitumoral mediado por células T en el tratamiento del carcinoma
de pulmón de Lewis (Garrido G., y otros, Cancer Immunol Immunother. 2007, 56: 1701–
1710).

- Otro de los blancos más estudiados son los gangliósidos, los cuales son
glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico en su estructura. Estas moléculas están
35 presentes en tejidos normales y sobre-expresadas en los tejidos tumorales (Zhang S, y

otros. Int J Cancer 73:42-49, 1997). Existen dos formas de ácido siálico: la N-acetilada y la N- glicolilada, esta última se ha descrito en tumores humanos (Malykh Y N., y otros, Biochimie. 2001, 83:7 623–634), tanto en forma de gangliósidos (Kawai T. y otros, 1991 Cancer. Res. (51) 1242-1246) como de las glicoproteínas N-glicoliladas (Devine P.L., y otros, Cancer Research, 1991, 51: 21, 5826–5836). Por esta razón estas moléculas han sido identificadas en gran número de tumores malignos convirtiéndolas en blancos atractivos para la terapia del cáncer. Particularmente, el gangliósido NeuGcGM3 lo reconoce específicamente el AcM 14F7 (Carr A. y otros, Hybridoma, 2000, 19: 3, 241–247). Este gangliósido ha sido identificado en diferentes tumores por varios métodos (Blanco R., y otros, ISRN Pathology. 2011, Article ID 953803, 10 pag., Marquina y otros, Cancer Research. 1996, 56: 22, 5165–5171)

La inmunoterapia activa contra NeuGcGM3 en tumores ha sido publicada al utilizar la vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP (Estevez F., y otros, Vaccine. 1999, 18:190-197) la cual ha demostrado su capacidad inmunogénica y su seguridad en pacientes con cáncer de mama avanzado (Carr A., y otros, JCO. 2003, 21:1015-1021). Por otro lado, se ha demostrado en preclínica que su potente efecto antitumoral (anti-metastásico), está mediado por un mecanismo de respuesta celular de células NK y CD8+ (Labrada M., y otros, Expert Opin. Biol. Ther. 2010, 10:2,153-162). Al mismo tiempo, se ha generado efecto anti-tumoral en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas al inmunizarlos con la vacuna anti-idiotípica (anticuerpo monoclonal anti-idiotípico 1E10 o Racotumumab que mimifica a gangliósidos N-glicolilados (Alfonso S., y otros, Cancer Biology & Therapy. 2007, 6:12, 1847-1852). Resultados publicados con esta vacuna demuestran la inmunogenicidad y la seguridad de la misma (Alfonso M., y otros, Journal of Immunology. 2002, 168: 2523–2529).

El REGF en los microdominios de membrana juega un papel esencial en el control del crecimiento de las células tumorales. Se ha demostrado que el gangliósido GM3 inhibe la proliferación dependiente del REGF en una gran variedad de líneas celulares, tanto *in vivo* como *in vitro*. GM3 inhibe la actividad quinasa del REGF (la autofosforilación del REGF). El gangliósido GM3 inhibe la autofosforilación del dominio quinasa del REGF. GM3 muestra la capacidad potencial de regular alostéricamente la transición estructural de la forma inactiva a la señalización por el dímero del REGF para la prevención de la autofosforilación del dominio quinasa intracelular a la unión del ligando (Coskun Ü., y otros, PNAS. 2011, 108: 22, 9044–9048). Los cambios en la composición de gangliósidos en la membrana son importantes en la regulación de la transducción de señales del REGF (Zurita AR., y otros, Biochem. J. 2001, 35: 465-472).

Resultados promisorios se esperan en la práctica médica de la aplicación simultánea o alternada de terapias anti-tumorales (Takeda K. y otros, Cancer Sci., 2007; 98: 9, 1297–1302). Pero no todas los esquemas de aplicación de terapias anti-tumorales dan resultados positivos y sinérgicos en la práctica. En un ensayo clínico en cáncer colorectal metastásico, Fase III, donde se usó el AcM anti-REGF (Cetuximab) y el AcM anti- factor de crecimiento del endotelio vascular (Bevacizumab), junto con un potente régimen de fármacos de quimioterapia se empeoró la evolución del cáncer, lo que provocó además eventos adversos más graves comparados con los pacientes que sólo recibieron Bevacizumab más quimioterapia (Tol J., y otros, N Engl J Med. 2009; 360:6,563-72). El éxito de la aplicación de varias terapias en un paciente: es el resultado de las relaciones funcionales específicas entre los blancos seleccionados para las mismas, la localización tumoral, así como, de la naturaleza de las terapias aplicadas en cada caso (anticuerpos, vacunas u otros).

Existen hoy evidencias en la literatura de una relación funcional y estructural entre los gangliósidos y REGF en células tumorales. Sin embargo, la implicación práctica de esta relación en el éxito de la aplicación en un mismo paciente de terapias contra los blancos EGFR y los gangliósidos no ha sido abordada ni en la clínica, ni en la preclínica. La novedad de la presente invención radica en la demostración preclínica y clínica por primera vez de una potenciación sinérgica en la actividad antitumoral derivada de aplicar las terapias anti-REGF y vacunas anti-NeuGcGM3, en tumores que co-expresan estos blancos.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, a composiciones farmacéuticas para cáncer dirigidas particularmente a los blancos REGF y gangliósido *N*-glicolil GM3 con el fin de potenciar el efecto terapéutico que producen las terapias contra dichos blancos por separado. En una modalidad, la invención comprende vacunas cuyo blanco es *N* glicolil GM3 y anticuerpos contra REGF. En otra modalidad, la invención comprende vacunas cuyo blanco es *N* glicolil GM3 y vacunas cuyo blanco es el REGF.

En modalidades adicionales de la invención, la vacuna contra el blanco gangliósido comprende vacunas tales como: vacuna NeuGcGM3/VSSP y/o la vacuna anti-idiotípica (AcM Racotumumab adyuvado en Alúmina). En otra modalidad la invención comprende terapias anti-REGF como el AcM Nimotuzumab y/o la vacuna contra REGF.

En otra modalidad la invención abarca una composición que comprende un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 para su uso en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende
5 cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención son útiles como medicamentos, y son útiles para la fabricación de medicamentos, se incluyen medicamentos para el tratamiento de afecciones, tales como cáncer.

10 En otra modalidad las composiciones terapéuticas de la presente invención son útiles en el tratamiento del cáncer, particularmente en tumores humanos de diferentes localizaciones. Preferentemente las composiciones terapéuticas de la presente invención se usan para el tratamiento de aquellos tumores en los que se expresen de manera simultánea el REGF y la variante *N*-glicolilada de los gangliósidos. Con mayor preferencia
15 se usa para el tratamiento de tumores de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido neuroectodérmico y desórdenes linfoproliferativos.

Cualquier formulación adecuada de un compuesto descrito anteriormente se puede preparar para la administración por los métodos conocidos en la materia. La selección de
20 los excipientes o portadores útiles se puede lograr sin una experimentación excesiva, sobre la base de la vía de administración deseada y las propiedades físicas del compuesto que se administra.

Cualquier vía de administración adecuada se puede usar, según lo determinado por el médico que trate el paciente, se incluyen pero no se limitan a: parenteral, intravenosa,
25 intramuscular, transdérmica, tópica y subcutánea. La preparación de formulaciones adecuadas para cada vía de administración se conoce en la materia.

La formulación de cada sustancia con frecuencia incluye un diluyente, así como, en algunos casos, adyuvantes, tampones, preservativos, etc. Estos compuestos también se pueden administrar en composiciones de liposomas o microemulsiones.

30 Para inyección, las formulaciones se pueden preparar en formas convencionales como: soluciones líquidas o suspensiones o formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en el líquido antes de la inyección. Los excipientes adecuados incluyen por ejemplo: agua, solución salina, dextrosa y similares.

Los compuestos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otro agente terapéutico. En modalidades particulares la invención se refiere a la combinación con quimioterapia y/o radioterapia convencional usada para el tipo de tumor que se trate.

En otra modalidad la presente invención también se refiere, a la aplicación simultánea, escalonada o alterna de terapias dirigidas contra los blancos REGF y el gangliósido *N*-glicolil GM3 en el tratamiento del cáncer.

El compuesto contra el REGF y el/los compuestos contra el blanco gangliósido *N*-glicolil GM3 se administran por separado, incluso en diferentes momentos y con diferentes frecuencias. Ambos compuestos se pueden administrar por cualquier vía conocida, como por vía: subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, y similares. En muchas modalidades, al menos uno y, opcionalmente, los dos agentes terapéuticos se pueden administrar por vía parenteral.

Cuando un compuesto o una composición de la invención se usan en combinación con otro agente anticancerígeno, la presente invención proporciona, por ejemplo, tratamiento simultáneo, escalonado, o alterno. Así, el/los compuestos de la invención se pueden administrar al mismo tiempo en composiciones farmacéuticas separadas, y donde un compuesto de la invención se puede administrar antes o después que el otro agente anticancerígeno, por ejemplo, con una diferencia de segundos, minutos, horas, días o semanas.

La presente invención proporciona métodos para controlar y/o inhibir la proliferación tumoral, que comprenden administrar la combinación de compuestos descritos en la presente a un sujeto que lo necesita en una cantidad efectiva para controlar o reducir la proliferación tumoral. En ciertas modalidades, la afección de la proliferación tumoral está asociada a un tumor en diferentes estadios clínicos, siempre que los tumores co-expresen el REGF y *N*-glicolil GM3. En una modalidad particular la presente invención se refiere a tumores de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido neuroectodérmico y desórdenes linfoproliferativos.

La invención también incluye métodos para tratar cáncer en un sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto contra el REGF útil para el tratamiento de dicho trastorno, y administrar al sujeto una vacuna NeuGcGM3 o una vacuna anti-idiotípica en una cantidad que es eficaz para mejorar el efecto deseado. Mejorar según la presente invención se refiere a regresión parcial o total o estabilización de los síntomas clínicos de la enfermedad. En otra modalidad de la presente invención, mejorar se refiere a disminuir el tamaño del tumor y/o inducir un aumento en la sobrevida del sujeto.

- En cierta modalidad la invención incluye un método que comprende una primera fase de inducción y una segunda fase de mantenimiento. En una modalidad particular, la fase de inducción comprende administrar al paciente la vacuna anti-REGF a dosis en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg, por un período de tiempo que puede estar en el intervalo desde aproximadamente 7 días a aproximadamente 14 días durante aproximadamente de 8 a 14 semanas. Durante ese período, a los pacientes se les administrará terapia anti-gangliósido NeuGcGM3 que comprende una vacuna NeuGcGM3 o vacuna anti-idiotípica a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg con intervalos de aproximadamente 7 a 14 días.
- La invención incluye un método que comprende administrar al paciente la terapia pasiva con anti-REGF a una dosis en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mg durante un intervalo de tiempo desde aproximadamente 6 a 10 semanas. En otra modalidad la terapia contra el REGF comprende la administración de una vacuna contra el REGF, a dosis en el intervalo desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg a intervalos de tiempo de aproximadamente 7 a 14 días. Durante ese período, los pacientes recibirán adicionalmente, la vacuna NeuGcGM3 o una vacuna anti-idiotípica a dosis en el intervalo desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg a intervalos de tiempo de aproximadamente 7 a 14 días.
- En otra modalidad, la segunda fase del método de tratamiento de la invención comprende un esquema del tratamiento que se diseña para su administración como terapia de mantenimiento mientras no aparezca toxicidad y/o síntomas clínicos de la enfermedad. En la fase de mantenimiento, las vacunas se administran preferentemente, a las dosis descritas anteriormente y a un intervalo de tiempo de aproximadamente 1 a 3 meses. En otra modalidad, las terapias pasivas, se administran en un intervalo desde aproximadamente 14 días a aproximadamente 3 meses. El esquema de la terapia se puede administrar durante un período de tiempo en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 años.
- En algunas modalidades, el agente terapéutico dirigido al REGF y la vacuna NeuGcGM3 o vacuna anti-idiotípica se administran en forma sustancialmente simultánea. El agente terapéutico dirigido al REGF y la vacuna NeuGcGM3 o la vacuna anti-idiotípica algunas veces se usan al mismo tiempo sobre el sujeto.
- En algunas modalidades la terapia anti-gangliósido NeuGcGM3 se puede administrar por vía: subcutánea, endovenosa, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, mientras que la terapia anti-REGF por vía subcutánea, endovenosa, o intramuscular. En otras

modalidades el sitio de administración se establece por la presencia de ganglios linfáticos aferentes.

En otra modalidad, durante la aplicación de las terapias, se registran ciertos parámetros bioquímicos e imagenológicos de los pacientes. Preferentemente la inmunidad celular y humoral se analiza mediante el uso de la sangre de los pacientes. Las extracciones de sangre se realizan con una frecuencia que puede ser desde semanal hasta cada seis meses.

“Co-expresión” tal como se usa en la presente invención se refiere a que ambos blancos estén expresados pero pueden o no tener una relación de cercanía estructural, el criterio operacional para esta definición es por determinación de la expresión del REGF y el gangliósido *N*-glicolilado (NeuGcGM3) mediante una doble tinción, uso de un microscopio fluorescente y un procesador que permita la superposición de imágenes.

“Co-localización” tal como se usa en la presente invención se refiere a que ambos blancos estén estructuralmente cercanos, el criterio operacional para esta definición es por determinación de la expresión del REGF y gangliósido *N*-glicolilado (NeuGcGM3) mediante una doble tinción y el uso de un microscopio confocal.

En una modalidad adicional la presente invención abarca el uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento que involucra:

(a) primero administrar al paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el receptor de EGF y,

(b) posteriormente administrar al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3.

La administración puede ser en este orden o en el orden contrario, donde primero se administra al paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 y posteriormente se administra al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el receptor de EGF.

En una modalidad particular la presente invención abarca un juego de reactivos para la terapia de tumores que co-expresen los blancos REGF y gangliósido NeuGcGM3, donde dicho juego de reactivos comprende la administración simultánea, escalonada o alterna de un compuesto contra el REGF y otro compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3.

Determinación de la co-expresión de REGF y gangliósido *N*-glicolilado (NeuGcGM3) en tumores humanos de diferentes localizaciones.

La medición de la expresión de los blancos terapéuticos REGF y NeuGcGM3 en los tumores, se puede realizar mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la materia para tales fines. Dicha medición se realiza en tumores de diferentes localizaciones y origen, sobre muestras de tumores que previamente se fijan en formol o sobre cortes de tejidos frescos. En una modalidad preferida, la detección se realiza mediante el empleo de técnicas inmunes para el reconocimiento del REGF y de la variante *N*-glicolilada del GM3. Se pueden usar particularmente la inmunohistoquímica y la microscopía de campo claro para el inmunorreconocimiento por separado de ambas moléculas o la inmunofluorescencia y la microscopía de fluorescencia para determinar la co-expresión o la inmunofluorescencia y la microscopía confocal para determinar la co-localización.

En modalidades preferidas de la presente invención el REGF se puede detectar mediante el uso del AcM lor egf/R3m (5-20µg/ml), descrito en la patente EP 0586002B1y el NeuGcGM3 se detecta mediante el uso del AcM 14F7m (5-25µg/ml) descrito en la patente EP 0972782B1 o US 6,429,295. En una modalidad de la presente invención, para el inmunorreconocimiento por separado de ambas moléculas (Simple tinción), se puede usar como sistema de detección Dako, LSAB^R System Peroxidase, DAB (Dako, Carpintería, California, EE.UU.).

Teniendo en cuenta que el REGF se localiza sobre la membrana citoplasmática de las células tumorales mientras que el *N*-glicolil GM3 se localiza en membrana e intracitoplasmático, se considerará que el inmunorreconocimiento es positivo, cuando el grado de intensidad de la reacción es igual o mayor al 20% de positividad.

En una modalidad preferida, la co-expresión de ambas moléculas se puede detectar mediante el uso de una técnica de doble tinción y se podría analizar por microscopía de fluorescencia, sólo en aquellas muestras tumorales donde previamente resultase positivo el inmunorreconocimiento para ambas moléculas por separado. Mientras la co-localización de ambas moléculas se puede detectar mediante el uso de una técnica de doble tinción y se analiza por microscopía de fluorescencia confocal. En una modalidad preferida el inmunorreconocimiento del REGF se realiza mediante la incubación con AcM lor egf/R3m (5-20µg/ml) durante 1 hr, seguido de un anticuerpo IgG conjugado a rodamina (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). En otra modalidad preferida, la inmunodetección del NeuGcGM3 se realiza mediante el uso de AcM 14F7 –biotinilado (5-20µg/ml), 30 min., seguido de estreptavidina conjugada a FITC (Dako, Carpintería, California, EE.UU.)

Los siguientes ejemplos muestran una modalidad preferida de la presente invención y por tanto sirven para ilustrarla pero en ningún caso deben considerarse como una limitación.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. El REGF se co-localiza con el gangliósido NeuGcGM3 en diferentes tumores murinos. Co-localización (C y F) del REGF y el gangliósido NeuGcGM3 en las metástasis pulmonares inducidas con el Carcinoma epidermoide de Lewis (A-C) y en el mieloma murino P3-X63-Ag.8653 (D-F).

Figura 2. La aplicación de terapia anti-REGF (AcM 7A7) y con vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (NeuGcGM3/VSSP), incrementa sinérgicamente la supervivencia de ratones C57BL/6 portadores del carcinoma pulmonar de Lewis.

Figura 3. Respuesta objetiva a la terapia pasiva contra el REGF (Nimotuzumab) y la vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (Racotumumab/Alúmina) en un paciente con carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

Figura 4. Respuesta clínica sorprendente a las terapias anti-REGF (Nimotuzumab) y vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (NeuGcGM3/VSSP) en paciente con hemangiopericitoma retroperitoneal-peripancreático.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Medición de la coexpresión del EGFR y del gangliósido NeuGcGM3 en diferentes tumores humanos.

Las muestras tumorales se fijaron en formol neutro tamponado y se procesaron mediante la técnica de inclusión por parafina, que es conocida por aquellos con experiencia en la materia. Los cortes de tejidos obtenidos con un grosor de 5 micras, se mantuvieron a 60 °C durante 30 min, se desparafinaron y rehidrataron en una serie de alcoholes decrecientes, se mantuvieron en agua destilada durante 10 min y se lavaron con TBS por 5 minutos. La reactividad de las proteínas totales del tejido se bloqueó con una solución comercial (Dako, Carpintería, California, EE.UU.) durante 30 min. El REGF se inmunodetectó mediante el uso del AcM lor egf/R3m (20µg/ml) durante 1 hr. El inmunorreconocimiento del NeuGcGM3, se realizó mediante el uso del AcM 14F7 (20µg/ml) durante 30 min. Después de la reacción de los anticuerpos primarios, en ambos casos, se usó el sistema de detección Dako, LSAB^R System Peroxidase, DAB (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). Los cortes de tejido se deshidrataron y se usó el contraste con Hematoxilina de Mayer (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). El control negativo se obtuvo sustituyendo el anticuerpo primario (AcM lor egf/R3m o AcM 14F7) por solución de lavado TBS (1X) y como control positivo, se usó el carcinoma ductal de mama.

El inmunorreconocimiento del REGF se localizó sobre la membrana citoplasmática de las células tumorales y el gangliósido NeuGcGM3 se detectó intracitoplasmático y/o en la membrana citoplasmática de las células.

Doble tinción: El REGF se detectó con el AcM lor egf/R3m (anti-REGF) a continuación se incubó con estreptavidina conjugada con FITC, (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). Mientras, el AcM 14F7 biotinilado (anti- NeuGcGM3) y posteriormente con el anticuerpo anti-IgG murina conjugado con rodamina, (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). La coexpresión de ambas moléculas en las células tumorales se identificó con el color amarillo en las imágenes. Los cortes de tejidos se analizaron y se digitalizaron mediante una cámara acoplada al Microscopio de Fluorescencia Olympus BX51 (Olympus, Japón). Para el análisis de las imágenes digitalizadas se usó el procesador de imágenes ImageJ versión 1.43u.

Tabla 1 muestra tumores de diferentes localizaciones donde el REGF y el gangliósido NeuGcGM3 se encuentran co-expresados.

Intensidad: - negativo, + débil, ++ moderado, +++ intenso.

	REGF		NeuGcGM3		Dobles positivos	
Tipos histológicos	Casos positivos (%)	Intensidad Rango	Casos positivos (%)	Intensidad Rango	Casos positivos (%)	Intensidad Rango
<i>Sistema respiratorio</i>						
NSCLC	8/10(80)	++/+++	6/10(60)	+/+++	6/10(60)	+/+++
<i>Sistema digestivo</i>						
Estómago (ADC)	3/3	++/+++	2/3(66,6	++/+++	2/3	+/+++
Colón-recto (ADC)	(100)	+/+++	)	+/+++	66,6)	++
Páncreas (ADC)	4/4	++/+++	4/4 100)	++/+++	4/4(100)	++
Hígado	(100)	++/+++	2/4(50)	++/+++	2/4(50)	+/+++
	3/4 (75)		3/4(75)		3/4 (75)	
	4/4(100)					
<i>Sistema urogenital</i>						
Vejiga	2/2	++/+++	1/2 (50)	++	1/2 (50)	++
	(100)					
<i>Sistema nervioso</i>						
Glioblastoma	5/5(100)	+++	3/5(60)	++	3/5(60)	++

multiforme						
Sarcomas	2/3	+/++	1/3	+	1/3(33,3	+
	(66,6)		(33,3)		)	
<i>Sistema hematopoyético</i>						
Linfoma	no	2/3(66,6	+	2/3	+	2/3(66,6
Hodking	)			(66,6)		)

Ejemplo 2. Medición de la coexpresión y co-localización de REGF y gangliósido NeuGcGM3 en modelos de tumores murinos

Los modelos de tumores murinos que se usaron fueron Carcinoma pulmonar de Lewis

5 (3LL-D122), y Mieloma P3-X63-Ag8.653 (X63).

Para determinar la co-expresión/co-localización se realizó una doble tinción. El inmunorreconocimiento del REGF se realizó mediante la incubación con AcM 7A7 (20µg/ml), biotinilado, durante 1 hr, seguido de la incubación con estreptavidina conjugada a FITC (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). La inmunotinción del NeuGcGM3 se

10 determinó mediante la incubación con AcM 14F7 (20µg/ml), 30 min., seguido de la incubación con un anticuerpo anti-IgG murino conjugado a rodamina (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). El control negativo se obtuvo mediante la sustitución del anticuerpo primario (AcM 7A7 o AcM 14F7) por solución de lavado TBS (1X). La co-expresión se

15 Japón) y para el análisis de las imágenes digitalizadas se usó el procesador de imágenes ImageJ versión 1.43u. La co-localización se determinó mediante un Microscopio láser confocal Flouview FV500 (Olympus, Japón).

La Figura 1 muestra la co-localización del REGF y el NeuGcGM3 en muestras tumorales de diversos modelos murinos. El REGF se identificó con el AcM 7A7 biotinilado seguido

20 de la estreptavidina unida a FITC. El color amarillo identifica la co-localización (C y F) de ambas moléculas en las células tumorales de los modelos murinos por la superposición de colores.

Ejemplo 3. Medición de la supervivencia de ratones C57BL/6 portadores del carcinoma pulmonar de Lewis tratados con la vacuna NeuGcGM3/VSSP y el AcM 7A7.

25 Modelo de metástasis espontáneas. A los animales se les inoculó en la almohadilla plantar derecha, 2x10⁵ células del Carcinoma epidermoide de Lewis (3LL-D122), en un volumen de 0.05 ml, lo cual correspondió al día 0 del protocolo experimental. El día 3 del

experimento los animales se aleatorizaron en 4 grupos experimentales, de 10 animales cada uno. El día 24, cuando el tumor alcanzó un volumen de entre 8-9 mm, se realizó cirugía de ese tumor primario. A partir del día 48, se comenzó la observación del estado clínico de los animales. Los datos de la supervivencia se analizaron mediante el uso del test de Log-rank, $p < 0.05$ y se muestran en una gráfica de Kaplan-Meier. El resultado incluye 3 experimentos en igualdad de condiciones.

Grupos experimentales

Control sin tratamiento. (T)

Terapia pasiva anti-REGF: AcM 7A7, por vía endovenosa a una dosis de 56 μg en 200 μl de SS, los días 3, 5, 7, 9, 31, 33 y 35.

Terapia activa anti-NeuGcGM3: vac. NeuGcGM3/VSSP, por vía subcutánea a una dosis de 200 μg en 200 μl , los días 7, 21, 35 y 47.

Administración simultánea de las terapias anti-EGFR y anti-NeuGcGM3, según lo descrito para los grupos 2 y 3.

En la Figura 2a se muestra que la administración simultánea de las terapias anti-EGFR y anti-NeuGcGM3 (grupo 4) en el modelo de las metástasis pulmonares inducidas con el carcinoma pulmonar de Lewis, incrementó la supervivencia de los animales en un 60%, comparado con los restantes grupos experimentales. Los animales sobrevivientes (solo en el grupo 4) se sacrificaron una semana después de concluido el experimento y se extrajeron los pulmones. El análisis macroscópico arrojó que sólo un animal mostró dos metástasis pulmonares, notándose además, la normalidad de los pulmones del resto de los animales. (Figura 2b). Este resultado evidencia una fuerte sinergia de la actividad antitumoral de las terapias anti-REGF y anti-NeuGcGM3 estudiadas, en este modelo tumoral murino donde el REGF y el NeuGcGM3 se encuentran co-localizados (ver Ejemplo 2)

Ejemplo 4. Medición de la supervivencia de pacientes con cáncer sometidos a terapia con el anticuerpo Nimotuzumab y la vacuna Racotumumab/Alúmina.

Teniendo en cuenta el hallazgo de la co-localización/co-expresión frecuente de los blancos terapéuticos, REGF y el gangliósido NeuGcGM3 en muestras de tumores de pulmón humano (Ejemplo 1); y la evidencia preclínica mostrada en el Ejemplo 3, se procedió a estudiar el tratamiento simultáneo con terapias anti-REGF (anticuerpo Nimotuzumab) y anti-gangliósido (vacuna anti-idiotípica, Racotumumab/Alúmina) en pacientes con cáncer de pulmón, que habían recibido las terapias estándar para cada

localización tumoral y que adicionalmente ya se encontraban en progresión de la enfermedad.

La Tabla 2 muestra los resultados del ensayo en el Programa de uso expandido (compasional) de la vacuna Racotumomab (1E10/Alúmina) o en combinación con el Nimotuzumab. En la misma se observa la supervivencia de pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en estadios avanzados (recurrentes y/o metastásicos). Se destaca que son pacientes los cuales habían recibido todas las líneas de tratamientos estándar establecidas, que eran solamente susceptibles de terapia paliativa no onco-específica y que en el momento de la inclusión en el ensayo se encontraban en progresión de la enfermedad. En el grupo de pacientes que recibió simultáneamente la terapia contra ambos blancos se observó un significativo incremento en la supervivencia global a los dos años de tratamiento, en comparación con los que recibieron solo las monoterapias.

Tabla 2. Incremento de la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas por la aplicación de terapias anti-REGF (anticuerpo Nimotuzumab) y anti-gangliósido (vacuna anti-idiotípica, Racotumumab/Alúmina), a los dos años de tratamiento.

Grupos de tratamientos	SV a 12 m (%)	SV a 24 m (%)
Racotumumab/Alúmina (n=86)	42.7	16.1
Nimotuzumab (n=165)	36	21.4
Racotumumab/Alúmina + Nimotuzumab (n=88)	40.7	37.7

La Figura 3 muestra la respuesta objetiva a la terapia pasiva contra el REGF (Nimotuzumab) y la vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (Racotumomab/Alúmina) en un paciente con CPCNP, que se mencionó anteriormente, había recibido todas las líneas de tratamientos estándar establecidas, la cual era solamente susceptible de terapia paliativa no onco-específica y que en el momento de la inclusión en el ensayo se encontraba en

progresión de la enfermedad. La Figura 3A muestra la localización y extensión del tumor en el momento del diagnóstico. En la Figura 3B, se observa el resultado de la Tomografía Axial Computarizada (TAC) a los dos años de aplicado el tratamiento donde sólo se pueden apreciar áreas de respuesta fibroblástica con áreas de aumento de la transparencia en relación con bulas de enfisema y no se observa la lesión tumoral pulmonar. La misma imagen radiológica se mantiene igual hasta 3 años después. Este resultado muestra una sorprendente remisión completa de un tumor muy avanzado, como resultado de la terapia.

10 Ejemplo 5. Medición de la respuesta clínica en un paciente con hemangiopericitoma retroperitoneal-peripancreático sometidos a tratamiento con el anticuerpo Nimotuzumab) y la vacuna NeuGcGM3/VSSP.

La Figura 4 muestra una tomografía computarizada secuencial del abdomen de una paciente con hemangiopericitoma retroperitoneal-peripancreático (tumor de tejidos blandos), sin respuesta a la radioterapia y quimioterapia. En el mismo se aplicaron las terapias anti-REGF (Nimotuzumab) y anti-gangliósido (vac. NeuGcGM3/VSSP), 18 meses después del diagnóstico inicial. El paciente presentaba, dolor intenso y palpitante masa tumoral en la región periumbilical y pérdida de peso de más de 15 kilos. Las Figuras 4 A y B corresponden al momento de comenzar con las terapias; C y D corresponden a la evaluación después de tres años. A los tres años después de aplicación del tratamiento se observa una estabilización de la enfermedad, pues en ambas imágenes, la masa tumoral mantiene la misma talla. Más aún, a los 72 meses de evaluación, el paciente mantiene una excelente calidad de vida incorporándose a su vida laboral con tendencia a la reducción de la masa tumoral. En resumen se observa un beneficio clínico sorprendente como respuesta al tratamiento aplicado.

Los pacientes con cáncer tratados con la inmunoterapia anti-REGF y anti-gangliósido, descrita en esta invención, muestran excelente tolerancia (no toxicidad relevante) durante largos períodos de tratamientos. La terapia favorece la estabilización de la enfermedad, incrementa la calidad de vida, el tiempo libre de progresión y por consiguiente la supervivencia global de los pacientes. La terapia descrita tiene un efecto superior al observado tradicionalmente en pacientes tratados con monoterapias anti-REGF o anti-gangliósido.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1 donde el compuesto contra el receptor de EGF es un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor de EGF.
3. La composición de la reivindicación 2 donde el anticuerpo contra el receptor de EGF es el AcM Nimotuzumab.
4. La composición de la reivindicación 1 donde el compuesto contra el receptor de EGF es una vacuna contra el REGF.
- 10 5. La composición de la reivindicación 1 donde el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 es una vacuna.
6. La composición de la reivindicación 5 donde la vacuna tiene como principio activo NeuGcGM3/VSSP.
- 15 7. La composición de la reivindicación 5 donde la vacuna es la vacuna anti-idiotípica con AcM Racotumumab adyuvado en Alúmina.
8. La composición de la reivindicación 1 que comprende una vacuna contra el REGF y una vacuna contra el gangliósido NeuGcGM3.
9. La composición de la reivindicación 1 donde el cáncer es un tumor que co-exprese los blancos REGF y gangliósido NeuGcGM3.
- 20 10. La composición de la reivindicación 1 donde el cáncer es un tumor seleccionado del grupo que comprende tumores de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido neuroectodérmico y desórdenes linfoproliferativos.
- 25 11. Uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento que involucra:
 - (a) primero administrar al paciente el medicamento que comprende el compuesto
 - 30 contra el receptor de EGF y,
 - (b) posteriormente administrar al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3.
12. Uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el

crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento que involucra:

(a) primero administrar al paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 y,

5 (b) posteriormente administrar al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el receptor de EGF.

13. Uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento
10 que involucra la administración simultánea, escalonada o alterna de terapias dirigidas contra los blancos REGF y el gangliósido *N*-glicolil GM3 en el tratamiento del cáncer:

14. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el compuesto contra el REGF es uno seleccionado de AcM Nimotuzumab o vacuna contra el REGF.

15 15. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 es una vacuna NeuGcGM3/VSSP o la vacuna anti-idiotípica Racotumumab/Alúmina.

16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la dosis del anticuerpo contra el REGF está en el intervalo de aproximadamente 100 a
20 aproximadamente 400 mg.

17. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la dosis de la vacuna contra el REGF está en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg.

18. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la dosis de la vacuna NeuGcGM3 o vacuna anti-idiotípica está en el intervalo de aproximadamente
25 0.1 a aproximadamente 2 mg.

19. Uso de un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, y un compuesto contra el receptor de EGF, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente, donde dicho paciente sufre de un tumor de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido
30 neuroectodérmico y/o desórdenes linfoproliferativos.

20. Uso de las composiciones farmacéuticas de las reivindicaciones 1 a 10 en combinación con radioterapia convencional.

21. Uso de las composiciones farmacéuticas de las reivindicaciones 1 a 10 en
35 combinación con quimioterapia convencional.

22. Uso de las composiciones farmacéuticas de las reivindicaciones 1 a 10 en combinación con radio y quimioterapia convencionales.
23. Un juego de reactivos para la terapia de tumores que co-expresen los blancos REGF y gangliósido NeuGcGM3, donde dicho juego de reactivos comprende la administración simultánea, escalonada o alterna de :
- 5
- (a): Compuesto contra el REGF
 - (b): Compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
4 de julio de 2013 (04.07.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/097834 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61P 35/00 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CU2012/000007

(22) Fecha de presentación internacional:

4 de diciembre de 2012 (04.12.2012)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

CU/P/2011/0245

27 de diciembre de 2011 (27.12.2011)

CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
[CU/CU]; Calle 216 Esq. a 15, Atabey. Playa., La Habana.
Cuba, La Habana 11600 (CU).

(72) Inventores; e

(71) Solicitantes (para US solamente): **GONZÁLEZ**

PALOMO, Adys [CU/CU]; Joaquín Delgado No. 412 e/.
N. Gerona y S. Agustín, Arroyo Naranjo., La Habana
19000 (CU). **CARR PEREZ, Adriana** [CU/CU]; Lacret
No. 155 e/. Heredia y Alcalde O'Farril., Stos Suarez, 10 de

Octubre, La Habana 10500 (CU). **LEÓN MONZÓN, Kalet** [CU/CU]; Calle: 31 No. 32009 e/. 320 y 322, Rpto Fraga, La Lisa., La Habana 13549 (CU). **BLANCO SANTANA, Rancés** [CU/CU]; Calle Zaragoza No. 189 e/ Calzada del Cerro y Manila, Apto 4^a, Apartado Postal, La Habana 10600 (CU). **BARROSO ALVAREZ, María del Carmen** [CU/CU]; Calle 180 No. 4905 e/. 49 y 51, Versalles, Lisa., La Habana 13549 (CU). **MACÍAS ABRAHAM, Amparo, Emilia** [CU/CU]; Calle 10 No. 208 Apto 114 e/. Línea y 11. Plaza, La Habana 10400 (CU). **MONTERO CASIMIRO, José Enrique** [CU/CU]; Calle 314 No. 2916 entre 29 y 31. Reparto, Juan de Dios Fraga, La Lisa., La Habana 13549 (CU).

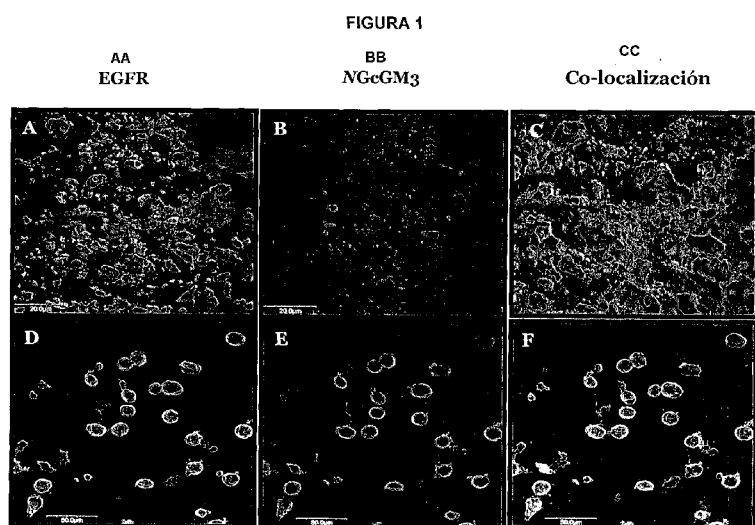
(74) Mandatario: **LÓPEZ MATILLA, Lien**; Calle 216 Esq. a 15, Atabey. Playa., La Habana. Cuba, La Habana 11600 (CU).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF TUMOURS THAT EXPRESS EGFR AND GANGLIOSIDE N-GLYCOLYL GM3 (NEUGC GM3)

(54) Título : COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES QUE EXPRESAN REGF Y GANGLIÓSIDO N-GLICOLIL GM3 (NeuGeGM3)



AA EGFR
BB NGcGM3
CC Co-localization

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutical composition for the treatment of malignant tumours, in particular tumours that express EGFR and N-glycolyl GM3 ganglioside targets, in order to enhance the therapeutic effect produced individually by therapies against said targets. The pharmaceutical compositions of the invention comprise antibodies and/or vaccines against each of the targets. In addition, the invention relates to the methods used to apply the compositions of the invention.

(57) Resumen: La presente invención se refiere, a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores malignos. Particularmente aquellos tumores que expresan los blancos REGF y gangliósido N-glicolil GM3 con el fin de potenciar el efecto terapéutico que producen las terapias contra dichos blancos por separado. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden anticuerpos y/o vacunas contra cada uno de los blancos. Adicionalmente la presente invención se refiere a los métodos para la aplicación de las composiciones de la

invención.

WO 2013/097834 A1



TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES QUE EXPRESAN REGF Y GANGLIÓSIDO N-GLICOLIL GM3 (NeuGcGM3)

5 CAMPO DE LA TÉCNICA

Esta invención se relaciona con la rama de la medicina humana, y particularmente con el tratamiento de tumores que sobre-expresan REGF y gangliósido *N*-glicolil (NeuGcGM3).

10 ANTECEDENTES

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (REGF) es uno de los blancos moleculares que más se usan en la evaluación clínica actual. Esta molécula se sobre-expresa en una gran variedad de tejidos epiteliales humanos (Yarden, Y., and Sliwkowski M. X., Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2001, 2: 127–137). Dos
15 tratamientos son los más utilizados en las terapias para la inhibición de la función del receptor de EGF: la neutralización por Anticuerpos monoclonales (AcMs) y las pequeñas moléculas inhibidoras de la actividad tirosina quinasa (TKI del inglés tirosin quinasa inhibitor) (Ciardiello, F., and Tortora G., N. Engl. J. Med. 2008, 358: 1160–1174). Aunque también se ha demostrado que una
20 vacuna con el dominio extracelular del REGF al utilizar el VSSP como adyuvante generó efecto anti-metastásico en el modelo murino de carcinoma pulmonar de Lewis (Sánchez Ramírez B., y otros, Int. J. Cancer. 2006, 119: 2190-2199). Los tratamientos con anticuerpos monoclonales anti-REGF median la regresión tumoral por la interrupción de señales oncogénicas y la inducción
25 de un mecanismo de respuesta inmune innata mediados por el receptor de Fc (Martinelli, E., y otros, Clin. Exp. Immunol. 2009, 158: 1–9).

Varios AcMs contra el REGF humano se han generado entre ellos: el Cetuximab (Garrett CR, y Eng C., Expert Opin Biol Ther. 2011; 11: 7, 937-49) y el Nimotuzumab (Mateo C, Immunotechnology 1997; 3:71-81). Se ha descrito el
30 efecto antitumoral del Nimotuzumab en la terapia de diferentes tumores que sobre-expresan el REGF (Crombet T, y otros, Cancer Biol Therapy. 2006, 5:375–379) o combinado con otros tratamientos (Crombet T, y otros, J Clin

Oncol. 2004, 22:1646–1654; Zhao KL, y otros, Invest New Drugs. 2011 Pre publicado on line Septiembre 8). Por otro lado, el AcM 7 A 7 generado contra el REGF murino demostró efecto antitumoral mediado por células T en el tratamiento del carcinoma de pulmón de Lewis (Garrido G., y otros, Cancer Immunol Immunother. 2007, 56: 1701–1710).

Otro de los blancos más estudiados son los gangliósidos, los cuales son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico en su estructura. Estas moléculas están presentes en tejidos normales y sobre-expresadas en los tejidos tumorales (Zhang S, y otros. Int J Cancer 73:42-49, 1997). Existen dos formas de ácido siálico: la N-acetilada y la N- glicolilada, esta última se ha descrito en tumores humanos (Malykh Y N., y otros, Biochimie. 2001, 83:7 623–634), tanto en forma de gangliósidos (Kawai T. y otros, 1991 Cancer. Res. (51) 1242-1246) como de las glicoproteínas N-glicoliladas (Devine P.L., y otros, Cancer Research, 1991, 51: 21, 5826–5836). Por esta razón estas moléculas han sido identificadas en gran número de tumores malignos convirtiéndolas en blancos atractivos para la terapia del cáncer. Particularmente, el gangliósido NeuGcGM3 lo reconoce específicamente el AcM 14F7 (Carr A. y otros, Hybridoma, 2000, 19: 3, 241–247). Este gangliósido ha sido identificado en diferentes tumores por varios métodos (Blanco R., y otros, ISRN Pathology. 2011, Article ID 953803, 10 pag., Marquina y otros, Cancer Research. 1996, 56: 22, 5165–5171)

La inmunoterapia activa contra NeuGcGM3 en tumores ha sido publicada al utilizar la vacuna molecular NeuGcGM3/VSSP (Estevez F., y otros, Vaccine. 1999, 18:190-197) la cual ha demostrado su capacidad inmunogénica y su seguridad en pacientes con cáncer de mama avanzado (Carr A., y otros, JCO. 2003, 21:1015-1021). Por otro lado, se ha demostrado en preclínica que su potente efecto antitumoral (anti-metastásico), está mediado por un mecanismo de respuesta celular de células NK y CD8+ (Labrada M., y otros, Expert Opin. Biol. Ther. 2010, 10:2,153-162). Al mismo tiempo, se ha generado efecto antitumoral en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas al inmunizarlos con la vacuna anti-idiotípica (anticuerpo monoclonal anti-idiotípico 1E10 o Racotumumab que mimifica a gangliósidos N-glicolilados (Alfonso S., y

otros, *Cancer Biology & Therapy*. 2007, 6:12, 1847-1852). Resultados publicados con esta vacuna demuestran la inmunogenicidad y la seguridad de la misma (Alfonso M., y otros, *Journal of Immunology*. 2002, 168: 2523–2529).

El REGF en los microdominios de membrana juega un papel esencial en el control del crecimiento de las células tumorales. Se ha demostrado que el gangliósido GM3 inhibe la proliferación dependiente del REGF en una gran variedad de líneas celulares, tanto *in vivo* como *in vitro*. GM3 inhibe la actividad quinasa del REGF (la autofosforilación del REGF). El gangliósido GM3 inhibe la autofosforilación del dominio quinasa del REGF. GM3 muestra la capacidad potencial de regular alostéricamente la transición estructural de la forma inactiva a la señalización por el dímero del REGF para la prevención de la autofosforilación del dominio quinasa intracelular a la unión del ligando (Coskun Ü., y otros, *PNAS*. 2011, 108: 22, 9044–9048). Los cambios en la composición de gangliósidos en la membrana son importantes en la regulación de la transducción de señales del REGF (Zurita AR., y otros, *Biochem. J.* 2001, 35: 465-472).

Resultados promisorios se esperan en la práctica médica de la aplicación simultánea o alternada de terapias anti-tumorales (Takeda K. y otros, *Cancer Sci.*, 2007; 98: 9, 1297–1302). Pero no todas los esquemas de aplicación de terapias anti-tumorales dan resultados positivos y sinérgicos en la práctica. En un ensayo clínico en cáncer colorectal metastásico, Fase III, donde se usó el AcM anti-REGF (Cetuximab) y el AcM anti- factor de crecimiento del endotelio vascular (Bevacizumab), junto con un potente régimen de fármacos de quimioterapia se empeoró la evolución del cáncer, lo que provocó además eventos adversos más graves comparados con los pacientes que sólo recibieron Bevacizumab más quimioterapia (Tol J., y otros, *N Engl J Med*. 2009; 360:6,563-72). El éxito de la aplicación de varias terapias en un paciente: es el resultado de las relaciones funcionales específicas entre los blancos seleccionados para las mismas, la localización tumoral, así como, de la naturaleza de las terapias aplicadas en cada caso (anticuerpos, vacunas u otros).

Existen hoy evidencias en la literatura de una relación funcional y estructural entre los gangliósidos y REGF en células tumorales. Sin embargo, la implicación práctica de esta relación en el éxito de la aplicación en un mismo paciente de terapias contra los blancos EGFR y los gangliósidos no ha sido
5 abordada ni en la clínica, ni en la preclínica. La novedad de la presente invención radica en la demostración preclínica y clínica por primera vez de una potenciación sinérgica en la actividad antitumoral derivada de aplicar las terapias anti-REGF y vacunas anti-NeuGcGM3, en tumores que co-expresan estos blancos.

10

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, a composiciones farmacéuticas para cáncer dirigidas particularmente a los blancos REGF y gangliósido *N*-glicolil GM3 con el fin de potenciar el efecto terapéutico que producen las terapias contra dichos
15 blancos por separado. En una modalidad, la invención comprende vacunas cuyo blanco es *N* glicolil GM3 y anticuerpos contra REGF. En otra modalidad, la invención comprende vacunas cuyo blanco es *N* glicolil GM3 y vacunas cuyo blanco es el REGF.

En modalidades adicionales de la invención, la vacuna contra el blanco
20 gangliósido comprende vacunas tales como: vacuna NeuGcGM3/VSSP y/o la vacuna anti-idiotípica (AcM Racotumumab adyuvado en Alúmina). En otra modalidad la invención comprende terapias anti-REGF como el AcM Nimotuzumab y/o la vacuna contra REGF.

En otra modalidad la invención abarca una composición que comprende un
25 compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 para su uso en el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos descritos anteriormente, mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Los compuestos de la invención son útiles como medicamentos, y son útiles para la fabricación de medicamentos, se incluyen medicamentos para el tratamiento de afecciones, tales como cáncer.

En otra modalidad las composiciones terapéuticas de la presente invención son útiles en el tratamiento del cáncer, particularmente en tumores humanos de diferentes localizaciones. Preferentemente las composiciones terapéuticas de la presente invención se usan para el tratamiento de aquellos tumores en los que se expresen de manera simultánea el REGF y la variante *N*-glicolilada de los gangliósidos. Con mayor preferencia se usa para el tratamiento de tumores de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido neuroectodérmico y desórdenes linfoproliferativos.

Cualquier formulación adecuada de un compuesto descrito anteriormente se puede preparar para la administración por los métodos conocidos en la materia. La selección de los excipientes o portadores útiles se puede lograr sin una experimentación excesiva, sobre la base de la vía de administración deseada y las propiedades físicas del compuesto que se administra.

Cualquier vía de administración adecuada se puede usar, según lo determinado por el médico que trate el paciente, se incluyen pero no se limitan a: parenteral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, tópica y subcutánea. La preparación de formulaciones adecuadas para cada vía de administración se conoce en la materia.

La formulación de cada sustancia con frecuencia incluye un diluyente, así como, en algunos casos, adyuvantes, tampones, preservativos, etc. Estos compuestos también se pueden administrar en composiciones de liposomas o microemulsiones.

Para inyección, las formulaciones se pueden preparar en formas convencionales como: soluciones líquidas o suspensiones o formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en el líquido antes de la inyección. Los excipientes adecuados incluyen por ejemplo: agua, solución salina, dextrosa y similares.

Los compuestos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otro agente terapéutico. En modalidades particulares la invención se refiere a la combinación con quimioterapia y/o radioterapia convencional usada para el tipo de tumor que se trate.

En otra modalidad la presente invención también se refiere, a la aplicación simultánea, escalonada o alterna de terapias dirigidas contra los blancos REGF y el gangliósido *N*-glicolil GM3 en el tratamiento del cáncer.

El compuesto contra el REGF y el/los compuestos contra el blanco gangliósido *N*-glicolil GM3 se administran por separado, incluso en diferentes momentos y con diferentes frecuencias. Ambos compuestos se pueden administrar por cualquier vía conocida, como por vía: subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, y similares. En muchas modalidades, al menos uno y, opcionalmente, los dos agentes terapéuticos se pueden administrar por vía parenteral.

Cuando un compuesto o una composición de la invención se usan en combinación con otro agente anticancerígeno, la presente invención proporciona, por ejemplo, tratamiento simultáneo, escalonado, o alterno. Así, el/los compuestos de la invención se pueden administrar al mismo tiempo en composiciones farmacéuticas separadas, y donde un compuesto de la invención se puede administrar antes o después que el otro agente anticancerígeno, por ejemplo, con una diferencia de segundos, minutos, horas, días o semanas.

La presente invención proporciona métodos para controlar y/o inhibir la proliferación tumoral, que comprenden administrar la combinación de compuestos descritos en la presente a un sujeto que lo necesita en una cantidad efectiva para controlar o reducir la proliferación tumoral. En ciertas modalidades, la afección de la proliferación tumoral está asociada a un tumor en diferentes estadios clínicos, siempre que los tumores co-expresen el REGF y *N*-glicolil GM3. En una modalidad particular la presente invención se refiere a tumores de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido neuroectodérmico y desórdenes linfoproliferativos.

La invención también incluye métodos para tratar cáncer en un sujeto que necesita dicho tratamiento, que comprende: administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto contra el REGF útil para el tratamiento de dicho trastorno, y administrar al sujeto una vacuna NeuGcGM3 o una vacuna anti-idiotípica en una cantidad que es eficaz para mejorar el efecto

deseado. Mejorar según la presente invención se refiere a regresión parcial o total o estabilización de los síntomas clínicos de la enfermedad. En otra modalidad de la presente invención, mejorar se refiere a disminuir el tamaño del tumor y/o inducir un aumento en la sobrevida del sujeto.

- 5 En cierta modalidad la invención incluye un método que comprende una primera fase de inducción y una segunda fase de mantenimiento. En una modalidad particular, la fase de inducción comprende administrar al paciente la vacuna anti-REGF a dosis en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg, por un período de tiempo que puede estar en el
- 10 intervalo desde aproximadamente 7 días a aproximadamente 14 días durante aproximadamente de 8 a 14 semanas. Durante ese período, a los pacientes se les administrará terapia anti-gangliósido NeuGcGM3 que comprende una vacuna NeuGcGM3 o vacuna anti-idiotípica a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg con intervalos de
- 15 aproximadamente 7 a 14 días.

La invención incluye un método que comprende administrar al paciente la terapia pasiva con anti-REGF a una dosis en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 mg durante un intervalo de tiempo desde aproximadamente 6 a 10 semanas. En otra modalidad la terapia contra el

20 REGF comprende la administración de una vacuna contra el REGF, a dosis en el intervalo desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg a intervalos de tiempo de aproximadamente 7 a 14 días. Durante ese período, los pacientes recibirán adicionalmente, la vacuna NeuGcGM3 o una vacuna anti-idiotípica a dosis en el intervalo desde aproximadamente 0.1 a

25 aproximadamente 2 mg a intervalos de tiempo de aproximadamente 7 a 14 días.

En otra modalidad, la segunda fase del método de tratamiento de la invención comprende un esquema del tratamiento que se diseña para su administración como terapia de mantenimiento mientras no aparezca toxicidad y/o síntomas

30 clínicos de la enfermedad. En la fase de mantenimiento, las vacunas se administran preferentemente, a las dosis descritas anteriormente y a un intervalo de tiempo de aproximadamente 1 a 3 meses. En otra modalidad, las

terapias pasivas, se administran en un intervalo desde aproximadamente 14 días a aproximadamente 3 meses. El esquema de la terapia se puede administrar durante un período de tiempo en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 años.

- 5 En algunas modalidades, el agente terapéutico dirigido al REGF y la vacuna NeuGcGM3 o vacuna anti-idiotípica se administran en forma sustancialmente simultánea. El agente terapéutico dirigido al REGF y la vacuna NeuGcGM3 o la vacuna anti-idiotípica algunas veces se usan al mismo tiempo sobre el sujeto.

En algunas modalidades la terapia anti-gangliósido NeuGcGM3 se puede
10 administrar por vía: subcutánea, endovenosa, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, mientras que la terapia anti-REGF por vía subcutánea, endovenosa, o intramuscular. En otras modalidades el sitio de administración se establece por la presencia de ganglios linfáticos aferentes.

En otra modalidad, durante la aplicación de las terapias, se registran ciertos
15 parámetros bioquímicos e imagenológicos de los pacientes. Preferentemente la inmunidad celular y humoral se analiza mediante el uso de la sangre de los pacientes. Las extracciones de sangre se realizan con una frecuencia que puede ser desde semanal hasta cada seis meses.

“Co-expresión” tal como se usa en la presente invención se refiere a que
20 ambos blancos estén expresados pero pueden o no tener una relación de cercanía estructural, el criterio operacional para esta definición es por determinación de la expresión del REGF y el gangliósido *N*-glicolilado (NeuGcGM3) mediante una doble tinción, uso de un microscopio fluorescente y un procesador que permita la superposición de imágenes.

25 “Co-localización” tal como se usa en la presente invención se refiere a que ambos blancos estén estructuralmente cercanos, el criterio operacional para esta definición es por determinación de la expresión del REGF y gangliósido *N*-glicolilado (NeuGcGM3) mediante una doble tinción y el uso de un microscopio confocal.

30 En una modalidad adicional la presente invención abarca el uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el

crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento que involucra:

(a) primero administrar al paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el receptor de EGF y,

5 (b) posteriormente administrar al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3.

La administración puede ser en este orden o en el orden contrario, donde primero se administra al paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 y posteriormente se administra al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el receptor de EGF.

En una modalidad particular la presente invención abarca un juego de reactivos para la terapia de tumores que co-expresen los blancos REGF y gangliósido NeuGcGM3, donde dicho juego de reactivos comprende la administración simultánea, escalonada o alterna de un compuesto contra el REGF y otro compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3.

Determinación de la co-expresión de REGF y gangliósido N-glicolilado (NeuGcGM3) en tumores humanos de diferentes localizaciones.

La medición de la expresión de los blancos terapéuticos REGF y NeuGcGM3 en los tumores, se puede realizar mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la materia para tales fines. Dicha medición se realiza en tumores de diferentes localizaciones y origen, sobre muestras de tumores que previamente se fijan en formol o sobre cortes de tejidos frescos. En una modalidad preferida, la detección se realiza mediante el empleo de técnicas inmunes para el reconocimiento del REGF y de la variante N-glicolilada del GM3. Se pueden usar particularmente la inmunohistoquímica y la microscopía de campo claro para el inmunorreconocimiento por separado de ambas moléculas o la inmunofluorescencia y la microscopía de fluorescencia para determinar la co-expresión o la inmunofluorescencia y la microscopía confocal para determinar la co-localización.

En modalidades preferidas de la presente invención el REGF se puede detectar mediante el uso del AcM lor egf/R3m (5-20µg/ml), descrito en la patente EP

0586002B1y el NeuGcGM3 se detecta mediante el uso del AcM 14F7m (5-25µg/ml) descrito en la patente EP 0972782B1 o US 6,429,295. En una modalidad de la presente invención, para el inmunorreconocimiento por separado de ambas moléculas (Simple tinción), se puede usar como sistema
5 de detección Dako, LSAB^R System Peroxidase, DAB (Dako, Carpintería, California, EE.UU.).

Teniendo en cuenta que el REGF se localiza sobre la membrana citoplasmática de las células tumorales mientras que el *N*-glicolil GM3 se localiza en membrana e intracitoplasmático, se considerará que el inmunorreconocimiento
10 es positivo, cuando el grado de intensidad de la reacción es igual o mayor al 20% de positividad.

En una modalidad preferida, la co-expresión de ambas moléculas se puede detectar mediante el uso de una técnica de doble tinción y se podría analizar por microscopía de fluorescencia, sólo en aquellas muestras tumorales donde
15 previamente resultase positivo el inmunorreconocimiento para ambas moléculas por separado. Mientras la co-localización de ambas moléculas se puede detectar mediante el uso de una técnica de doble tinción y se analiza por microscopía de fluorescencia confocal. En una modalidad preferida el inmunorreconocimiento del REGF se realiza mediante la incubación con AcM
20 lor egf/R3m (5-20µg/ml) durante 1 hr, seguido de un anticuerpo IgG conjugado a rodamina (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). En otra modalidad preferida, la inmunodetección del NeuGcGM3 se realiza mediante el uso de AcM 14F7 –biotinilado (5-20µg/ml), 30 min., seguido de estreptavidina conjugada a FITC (Dako, Carpintería, California, EE.UU.)

25 Los siguientes ejemplos muestran una modalidad preferida de la presente invención y por tanto sirven para ilustrarla pero en ningún caso deben considerarse como una limitación.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

30 Figura 1. El REGF se co-localiza con el gangliósido NeuGcGM3 en diferentes tumores murinos. Co-localización (C y F) del REGF y el gangliósido

NeuGcGM3 en las metástasis pulmonares inducidas con el Carcinoma epidermoide de Lewis (A-C) y en el mieloma murino P3-X63-Ag.8653 (D-F).

Figura 2. La aplicación de terapia anti-REGF (AcM 7A7) y con vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (NeuGcGM3/VSSP), incrementa sinérgicamente la supervivencia de ratones C57BL/6 portadores del carcinoma pulmonar de Lewis.

Figura 3. Respuesta objetiva a la terapia pasiva contra el REGF (Nimotuzumab) y la vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (Racotumumab/Alúmina) en un paciente con carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

Figura 4. Respuesta clínica sorprendente a las terapias anti-REGF (Nimotuzumab) y vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (NeuGcGM3/VSSP) en paciente con hemangiopericitoma retroperitoneal-peripancreático.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Medición de la coexpresión del EGFR y del gangliósido NeuGcGM3 en diferentes tumores humanos.

Las muestras tumorales se fijaron en formol neutro tamponado y se procesaron mediante la técnica de inclusión por parafina, que es conocida por aquellos con experiencia en la materia. Los cortes de tejidos obtenidos con un grosor de 5 micras, se mantuvieron a 60 ° C durante 30 min, se desparafinaron y rehidrataron en una serie de alcoholes decrecientes, se mantuvieron en agua destilada durante 10 min y se lavaron con TBS por 5 minutos. La reactividad de las proteínas totales del tejido se bloqueó con una solución comercial (Dako, Carpintería, California, EE.UU.) durante 30 min. El REGF se inmunodetectó mediante el uso del AcM lor egf/R3m (20µg/ml) durante 1 hr. El inmunorreconocimiento del NeuGcGM3, se realizó mediante el uso del AcM 14F7 (20µg/ml) durante 30 min. Después de la reacción de los anticuerpos primarios, en ambos casos, se usó el sistema de detección Dako, LSAB^R System Peroxidase, DAB (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). Los cortes de tejido se deshidrataron y se usó el contraste con Hematoxilina de Mayer (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). El control negativo se obtuvo sustituyendo el

anticuerpo primario (AcM lor egf/R3m o AcM 14F7) por solución de lavado TBS (1X) y como control positivo, se usó el carcinoma ductal de mama.

El inmunorreconocimiento del REGF se localizó sobre la membrana citoplasmática de las células tumorales y el gangliósido NeuGcGM3 se detectó intracitoplasmático y/o en la membrana citoplasmática de las células.

Doble tinción: El REGF se detectó con el AcM lor egf/R3m (anti-REGF) a continuación se incubó con estreptavidina conjugada con FITC, (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). Mientras, el AcM 14F7 biotinilado (anti-NeuGcGM3) y posteriormente con el anticuerpo anti-IgG murina conjugado con rodamina, (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). La coexpresión de ambas moléculas en las células tumorales se identificó con el color amarillo en las imágenes. Los cortes de tejidos se analizaron y se digitalizaron mediante una cámara acoplada al Microscopio de Fluorescencia Olympus BX51 (Olympus, Japón). Para el análisis de las imágenes digitalizadas se usó el procesador de imágenes ImageJ versión 1.43u.

Tabla 1 muestra tumores de diferentes localizaciones donde el REGF y el gangliósido NeuGcGM3 se encuentran co-expresados.

Intensidad: - negativo, + débil, ++ moderado, +++ intenso.

	REGF		NeuGcGM3		Dobles positivos	
Tipos histológicos	Casos positivos (%)	Intensidad Rango	Casos positivos (%)	Intensidad Rango	Casos positivos (%)	Intensidad Rango
<i>Sistema respiratorio</i>	8/10(80)	++/+++	6/10(60)	+ /+++	6/10(60)	+ /+++
NSCLC						
<i>Sistema digestivo</i>	3/3 (100)	++/+++	2/3(66,6)	++/+++	2/3 66,6)	+ /+++
Estómago (ADC)	4/4 (100)	+ /+++	4/4 100)	+ /+++	4/4(100)	++
Colón-recto (ADC)	3/4 (75)	++/+++	2/4(50)	++/+++	2/4(50)	++
Páncreas (ADC)	4/4(100)	++/+++	3/4(75)	++/+++	3/4 (75)	+ /+++
Hígado						

<i>Sistema</i> <i>urogenital</i> Vejiga	2/2 (100)	++/+++	1/2 (50)	++	1/2 (50)	++
<i>Sistema</i> <i>nervioso</i> Glioblastoma multiforme	5/5(100)	+++	3/5(60)	++	3/5(60)	++
Sarcomas	2/3 (66,6)	+ /++	1/3 (33,3)	+	1/3(33,3)	+
<i>Sistema</i> <i>hematopoyético</i> Linfoma no Hodking	2/3(66,6)	+	2/3 (66,6)	+	2/3(66,6)	+

Ejemplo 2. Medición de la coexpresión y co-localización de REGF y gangliósido NeuGcGM3 en modelos de tumores murinos

Los modelos de tumores murinos que se usaron fueron Carcinoma pulmonar de Lewis (3LL-D122), y Mieloma P3-X63-Ag8.653 (X63).

Para determinar la co-expresión/co-localización se realizó una doble tinción. El inmunorreconocimiento del REGF se realizó mediante la incubación con AcM 7A7 (20µg/ml), biotinilado, durante 1 hr, seguido de la incubación con estreptavidina conjugada a FITC (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). La inmunotinción del NeuGcGM3 se determinó mediante la incubación con AcM 14F7 (20µg/ml), 30 min., seguido de la incubación con un anticuerpo anti-IgG murino conjugado a rodamina (Dako, Carpintería, California, EE.UU.). El control negativo se obtuvo mediante la sustitución del anticuerpo primario (AcM 7A7 o AcM 14F7) por solución de lavado TBS (1X). La co-expresión se determinó mediante el uso de un Microscopio de Fluorescencia Olympus BX51 (Olympus, Japón) y para el análisis de las imágenes digitalizadas se usó el procesador de imágenes ImageJ versión 1.43u. La co-localización se determinó mediante un Microscopio láser confocal Flouview FV500 (Olympus, Japón).

La Figura 1 muestra la co-localización del REGF y el NeuGcGM3 en muestras tumorales de diversos modelos murinos. El REGF se identificó con el AcM 7A7

biotinilado seguido de la estreptavidina unida a FITC. El color amarillo identifica la co-localización (C y F) de ambas moléculas en las células tumorales de los modelos murinos por la superposición de colores.

Ejemplo 3. Medición de la supervivencia de ratones C57BL/6 portadores del carcinoma pulmonar de Lewis tratados con la vacuna NeuGcGM3/VSSP y el AcM 7A7.

Modelo de metástasis espontáneas. A los animales se les inoculó en la almohadilla plantar derecha, 2×10^5 células del Carcinoma epidermoide de Lewis (3LL-D122), en un volumen de 0.05 ml, lo cual correspondió al día 0 del protocolo experimental. El día 3 del experimento los animales se aleatorizaron en 4 grupos experimentales, de 10 animales cada uno. El día 24, cuando el tumor alcanzó un volumen de entre 8-9 mm, se realizó cirugía de ese tumor primario. A partir del día 48, se comenzó la observación del estado clínico de los animales. Los datos de la supervivencia se analizaron mediante el uso del test de Log-rank, $p < 0.05$ y se muestran en una gráfica de Kaplan-Meier. El resultado incluye 3 experimentos en igualdad de condiciones.

Grupos experimentales

Control sin tratamiento. (T)

Terapia pasiva anti-REGF: AcM 7A7, por vía endovenosa a una dosis de 56 μg en 200 μl de SS, los días 3, 5, 7, 9, 31, 33 y 35.

Terapia activa anti-NeuGcGM3: vac. NeuGcGM3/VSSP, por vía subcutánea a una dosis de 200 μg en 200 μl , los días 7, 21, 35 y 47.

Administración simultánea de las terapias anti-EGFR y anti-NeuGcGM3, según lo descrito para los grupos 2 y 3.

En la Figura 2a se muestra que la administración simultánea de las terapias anti-EGFR y anti-NeuGcGM3 (grupo 4) en el modelo de las metástasis pulmonares inducidas con el carcinoma pulmonar de Lewis, incrementó la supervivencia de los animales en un 60%, comparado con los restantes grupos experimentales. Los animales sobrevivientes (solo en el grupo 4) se sacrificaron una semana después de concluido el experimento y se extrajeron los pulmones. El análisis macroscópico arrojó que sólo un animal mostró dos metástasis pulmonares, notándose además, la normalidad de los pulmones del

resto de los animales. (Figura 2b). Este resultado evidencia una fuerte sinergia de la actividad antitumoral de las terapias anti-REGF y anti-NeuGcGM3 estudiadas, en este modelo tumoral murino donde el REGF y el NeuGcGM3 se encuentran co-localizados (ver Ejemplo 2)

5

Ejemplo 4. Medición de la supervivencia de pacientes con cáncer sometidos a terapia con el anticuerpo Nimotuzumab y la vacuna Racotumumab/Alúmina.

Teniendo en cuenta el hallazgo de la co-localización/co-expresión frecuente de los blancos terapéuticos, REGF y el gangliósido NeuGcGM3 en muestras de tumores de pulmón humano (Ejemplo 1); y la evidencia preclínica mostrada en el Ejemplo 3, se procedió a estudiar el tratamiento simultáneo con terapias anti-REGF (anticuerpo Nimotuzumab) y anti-gangliósido (vacuna anti-idiotípica, Racotumumab/Alúmina) en pacientes con cáncer de pulmón, que habían recibido las terapias estándar para cada localización tumoral y que adicionalmente ya se encontraban en progresión de la enfermedad.

La Tabla 2 muestra los resultados del ensayo en el Programa de uso expandido (compasional) de la vacuna Racotumomab (1E10/Alúmina) o en combinación con el Nimotuzumab. En la misma se observa la supervivencia de pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en estadios avanzados (recurrentes y/o metastásicos). Se destaca que son pacientes los cuales habían recibido todas las líneas de tratamientos estándar establecidas, que eran solamente susceptibles de terapia paliativa no onco-específica y que en el momento de la inclusión en el ensayo se encontraban en progresión de la enfermedad. En el grupo de pacientes que recibió simultáneamente la terapia contra ambos blancos se observó un significativo incremento en la supervivencia global a los dos años de tratamiento, en comparación con los que recibieron solo las monoterapias.

Tabla 2. Incremento de la supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas por la aplicación de terapias anti-REGF (anticuerpo Nimotuzumab) y anti-gangliósido (vacuna anti-idiotípica, Racotumumab/Alúmina), a los dos años de tratamiento.

Grupos de tratamientos	SV a 12 m (%)	SV a 24 m (%)
Racotumumab/Alúmina (n=86)	42.7	16.1
Nimotuzumab (n=165)	36	21.4
Racotumumab/Alúmina + Nimotuzumab (n=88)	40.7	37.7

La Figura 3 muestra la respuesta objetiva a la terapia pasiva contra el REGF (Nimotuzumab) y la vacuna anti-gangliósido NeuGcGM3 (Racotumomab/Alúmina) en un paciente con CPCNP, que se mencionó anteriormente, había recibido todas las líneas de tratamientos estándar establecidas, la cual era solamente susceptible de terapia paliativa no onco-específica y que en el momento de la inclusión en el ensayo se encontraba en progresión de la enfermedad. La Figura 3A muestra la localización y extensión del tumor en el momento del diagnóstico. En la Figura 3B, se observa el resultado de la Tomografía Axial Computarizada (TAC) a los dos años de aplicado el tratamiento donde sólo se pueden apreciar áreas de respuesta fibroblástica con áreas de aumento de la transparencia en relación con bulas de enfisema y no se observa la lesión tumoral pulmonar. La misma imagen radiológica se mantiene igual hasta 3 años después. Este resultado muestra una sorprendente remisión completa de un tumor muy avanzado, como resultado de la terapia.

Ejemplo 5. Medición de la respuesta clínica en un paciente con hemangiopericitoma retroperitoneal-peripaneático sometidos a tratamiento con el anticuerpo Nimotuzumab) y la vacuna NeuGcGM3/VSSP.

La Figura 4 muestra una tomografía computarizada secuencial del abdomen de una paciente con hemangiopericitoma retroperitoneal-peripaneático (tumor de

tejidos blandos), sin respuesta a la radioterapia y quimioterapia. En el mismo se aplicaron las terapias anti-REGF (Nimotuzumab) y anti-gangliósido (vac. NeuGcGM3/VSSP), 18 meses después del diagnóstico inicial. El paciente presentaba, dolor intenso y palpitante masa tumoral en la región periumbilical y pérdida de peso de más de 15 kilos. Las Figuras 4 A y B corresponden al momento de comenzar con las terapias; C y D corresponden a la evaluación después de tres años. A los tres años después de aplicación del tratamiento se observa una estabilización de la enfermedad, pues en ambas imágenes, la masa tumoral mantiene la misma talla. Más aún, a los 72 meses de evaluación, el paciente mantiene una excelente calidad de vida incorporándose a su vida laboral con tendencia a la reducción de la masa tumoral. En resumen se observa un beneficio clínico sorprendente como respuesta al tratamiento aplicado.

Los pacientes con cáncer tratados con la inmunoterapia anti-REGF y anti-gangliósido, descrita en esta invención, muestran excelente tolerancia (no toxicidad relevante) durante largos períodos de tratamientos. La terapia favorece la estabilización de la enfermedad, incrementa la calidad de vida, el tiempo libre de progresión y por consiguiente la supervivencia global de los pacientes. La terapia descrita tiene un efecto superior al observado tradicionalmente en pacientes tratados con monoterapias anti-REGF o anti-gangliósido.

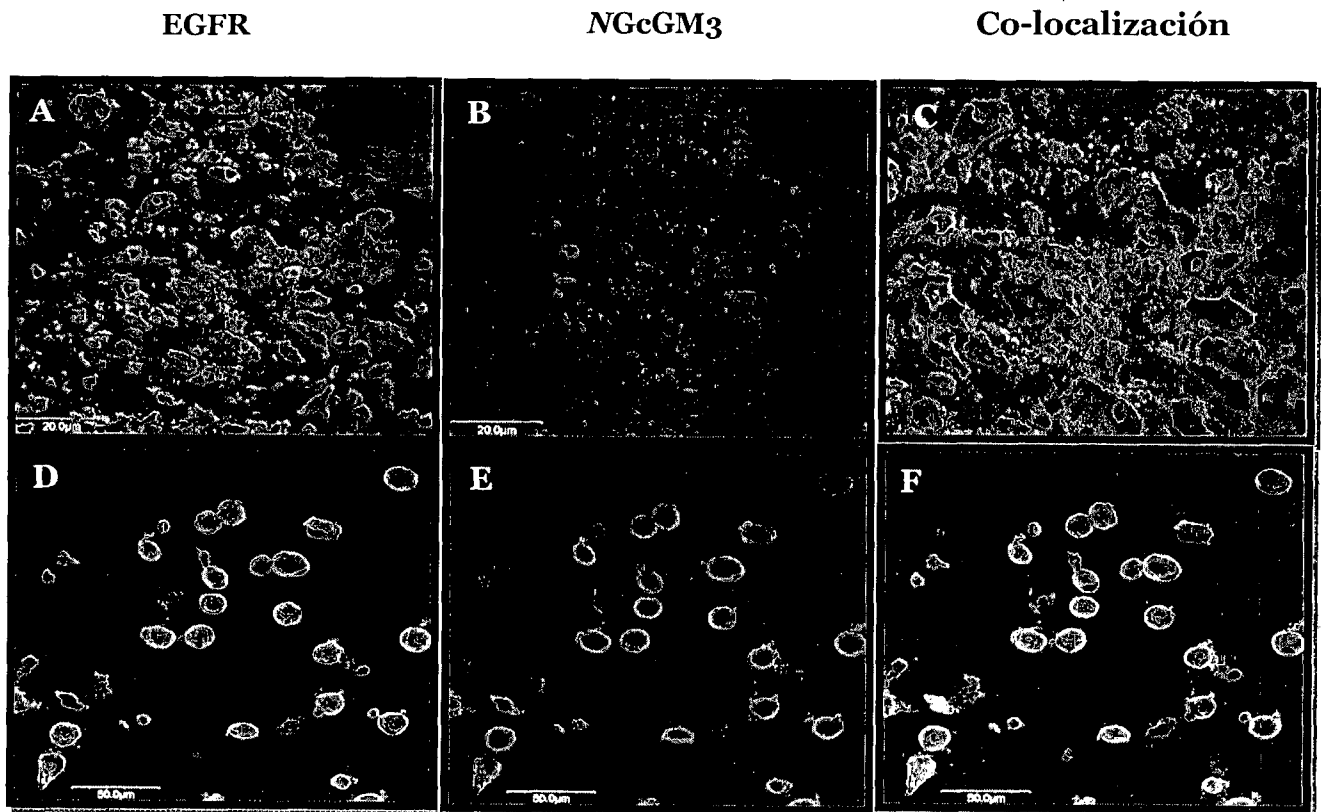
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1 donde el compuesto contra el receptor de EGF es un anticuerpo monoclonal que reconoce el receptor de EGF.
3. La composición de la reivindicación 2 donde el anticuerpo contra el receptor de EGF es el AcM Nimotuzumab.
- 10 4. La composición de la reivindicación 1 donde el compuesto contra el receptor de EGF es una vacuna contra el REGF.
5. La composición de la reivindicación 1 donde el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 es una vacuna.
6. La composición de la reivindicación 5 donde la vacuna tiene como principio activo NeuGcGM3/VSSP.
- 15 7. La composición de la reivindicación 5 donde la vacuna es la vacuna anti-idiotípica con AcM Racotumumab adyuvado en Alúmina.
8. La composición de la reivindicación 1 que comprende una vacuna contra el REGF y una vacuna contra el gangliósido NeuGcGM3.
- 20 9. La composición de la reivindicación 1 donde el cáncer es un tumor que co-exprese los blancos REGF y gangliósido NeuGcGM3.
10. La composición de la reivindicación 1 donde el cáncer es un tumor seleccionado del grupo que comprende tumores de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido neuroectodérmico y desórdenes linfoproliferativos.
- 25 11. Uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento que involucra:
 - 30 (a) primero administrar al paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el receptor de EGF y,

- (b) posteriormente administrar al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3.
12. Uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento que involucra:
- 5 (a) primero administrar al paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 y,
- (b) posteriormente administrar al mismo paciente el medicamento que comprende el compuesto contra el receptor de EGF.
- 10 13. Uso de un compuesto contra el receptor de EGF y un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente de acuerdo con el régimen de tratamiento que involucra la administración simultánea,
- 15 escalonada o alterna de terapias dirigidas contra los blancos REGF y el gangliósido *N*-glicolil GM3 en el tratamiento del cáncer:
14. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el compuesto contra el REGF es uno seleccionado de AcM Nimotuzumab o vacuna contra el REGF.
- 20 15. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3 es una vacuna NeuGcGM3/VSSP o la vacuna anti-idiotípica Racotumumab/Alúmina.
16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la dosis del anticuerpo contra el REGF está en el intervalo de aproximadamente
- 25 100 a aproximadamente 400 mg.
17. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la dosis de la vacuna contra el REGF está en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg.
18. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la dosis de la vacuna NeuGcGM3 o vacuna anti-idiotípica está en el intervalo de
- 30 aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2 mg.

19. Uso de un compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3, y un compuesto contra el receptor de EGF, para la preparación de un medicamento para retardar el crecimiento de un tumor en un paciente, donde dicho paciente sufre de un tumor de pulmón, mama, aparato digestivo, sistema urogenital, sarcomas, derivados de tejido neuroectodérmico y/o desórdenes linfoproliferativos.
20. Uso de las composiciones farmacéuticas de las reivindicaciones 1 a 10 en combinación con radioterapia convencional.
21. Uso de las composiciones farmacéuticas de las reivindicaciones 1 a 10 en combinación con quimioterapia convencional.
22. Uso de las composiciones farmacéuticas de las reivindicaciones 1 a 10 en combinación con radio y quimioterapia convencionales.
23. Un juego de reactivos para la terapia de tumores que co-expresen los blancos REGF y gangliósido NeuGcGM3, donde dicho juego de reactivos comprende la administración simultánea, escalonada o alterna de :
- (a): Compuesto contra el REGF
 - (b): Compuesto contra el gangliósido NeuGcGM3

FIGURA 1



2/3

FIGURA 2

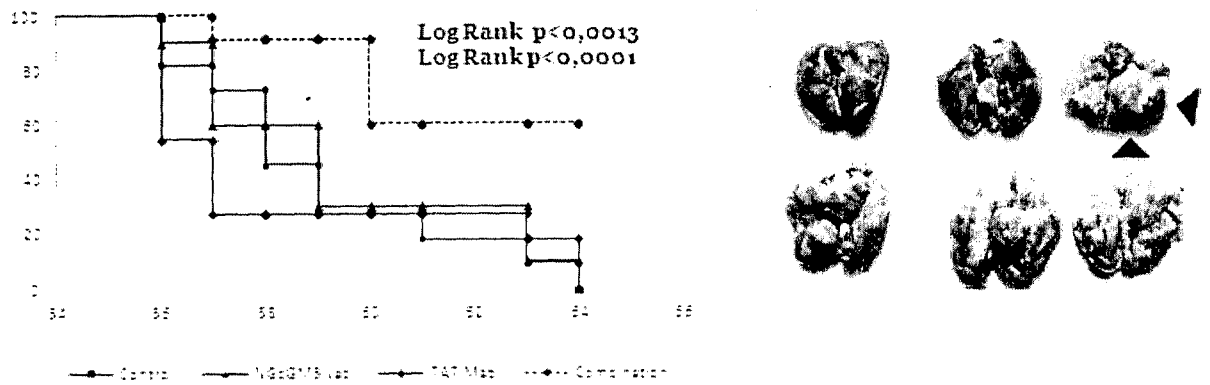
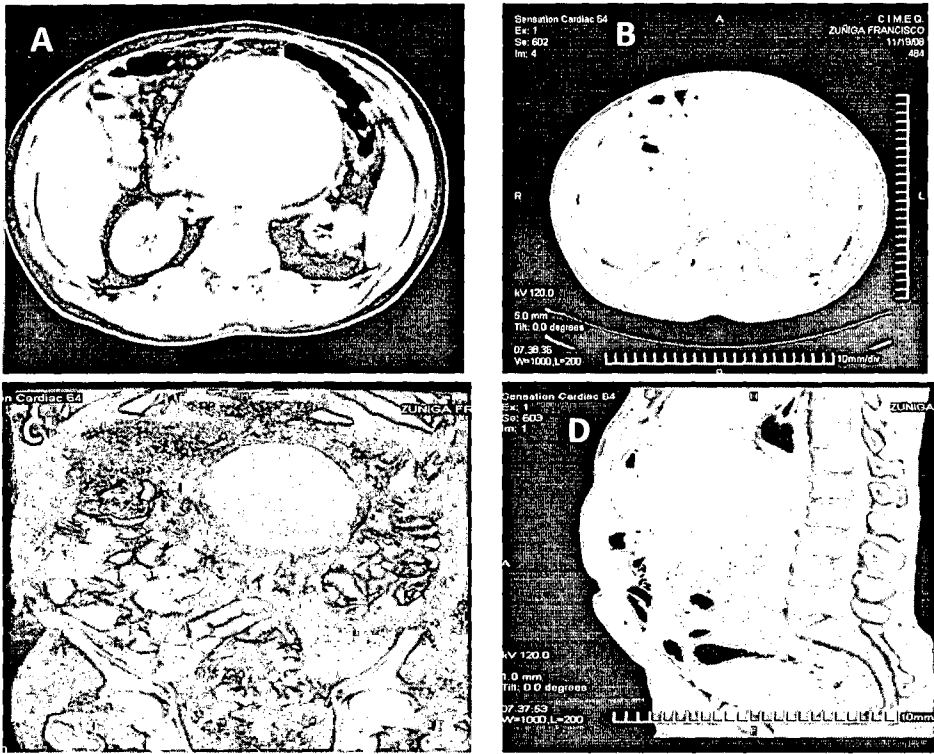


FIGURA 3.



FIGURA 4



INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2012/000007

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A61P35/00 C07K16/28 C07K16/42 A61K39/00 A61K39/395

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)

C07K 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) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	EP 0 586 002 A2 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU] CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CH]) 9 Marzo 1994 (1994-03-09) pagina 5, lineas 1-34 pagina 11, lineas 27-34 ejemplo 5	1-23
A	EP 1 798 243 A2 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU]) 20 Junio 2007 (2007-06-20) todo el documento	1-23

☒ 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: “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). “O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. “P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	“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. “X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. “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. “&” 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
14 Febrero 2013	25/03/2013
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Covone-van Hees, M
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2012/000007

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	WEIS F M ET AL: "Regulation of epidermal growth factor receptor signal transduction. Role of gangliosides.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 15 JUL 1990, vol. 265, no. 20, 15 Julio 1990 (1990-07-15), paginas 12059-12066, XP002691996, ISSN: 0021-9258 todo el documento	1-23
A	----- HANAI N ET AL: "A novel ganglioside, de-N-acetyl-GM3 (II3NeuNH2LacCer), acting as a strong promoter for epidermal growth factor receptor kinase and as a stimulator for cell growth.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 5 Mayo 1988, vol. 263, no. 13, 5 Mayo 1988 (1988-05-05), pages 6296-6301, XP002691997, ISSN: 0021-9258 todo el documento -----	1-23

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2012/000007

EP 0586002	A2	09-03-1994	AT	188874	T	15-02-2000
			DE	69327620	D1	24-02-2000
			DE	69327620	T2	03-08-2000
			DK	0586002	T3	19-06-2000
			EP	0586002	A2	09-03-1994
			ES	2144440	T3	16-06-2000
			GR	3033290	T3	29-09-2000
			PT	586002	E	31-07-2000

EP 1798243	A2	20-06-2007	AR	033122	A1	03-12-2003
			AR	033123	A1	03-12-2003
			AT	378356	T	15-11-2007
			AT	406386	T	15-09-2008
			AT	477279	T	15-08-2010
			AU	2002308347	B2	14-09-2006
			AU	2007231687	A1	22-11-2007
			BG	108227	A	30-04-2005
			BG	108228	A	30-04-2005
			BR	0208675	A	03-08-2004
			BR	0208676	A	08-04-2008
			CA	2441845	A1	17-10-2002
			CA	2443372	A1	17-10-2002
			CN	1507452	A	23-06-2004
			CN	1535282	A	06-10-2004
			CN	101054417	A	17-10-2007
			CU	23007	A1	17-12-2004
			CZ	20032641	A3	14-07-2004
			CZ	20032668	A3	14-07-2004
			DE	60223547	T2	18-09-2008
			DK	1384726	T3	15-12-2008
			DK	1411064	T3	25-03-2008
			EC	SP034787	A	28-01-2004
			EC	SP034788	A	28-01-2004
			EP	1384726	A2	28-01-2004
			EP	1411064	A2	21-04-2004
			EP	1798243	A2	20-06-2007
			ES	2296986	T3	01-05-2008
			ES	2312610	T3	01-03-2009
			HK	1066818	A1	07-12-2007
			HK	1070080	A1	04-07-2008
			HR	P20030805	A2	31-08-2005
			HR	P20030806	A2	31-08-2005
			HU	228105	B1	28-11-2012
			HU	0401355	A2	28-10-2004
			IL	158246	A	31-05-2010
			IS	6964	A	23-09-2003
			IS	6965	A	23-09-2003
			JP	4366080	B2	18-11-2009
			JP	2004525953	A	26-08-2004
			JP	2004528033	A	16-09-2004
			KR	20080080680	A	04-09-2008
			MX	PA03008738	A	11-12-2003
			MX	PA03008739	A	11-12-2003
			MY	137078	A	31-12-2008
			NO	20034436	A	02-12-2003
			NO	20034437	A	02-12-2003
			NZ	528598	A	24-03-2005
			NZ	528599	A	24-03-2005

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2012/000007

PE	09722002	A1	02-01-2003
PL	208109	B1	31-03-2011
PT	1384726	E	05-12-2008
PT	1411064	E	12-02-2008
SG	161737	A1	29-06-2010
SI	1384726	T1	30-04-2009
SI	1411064	T1	30-04-2008
SK	12162003	A3	04-05-2004
SK	12262003	A3	03-08-2004
UA	75393	C2	15-12-2003
UA	76745	C2	15-12-2003
US	2004253233	A1	16-12-2004
US	2005069535	A1	31-03-2005
US	2010297008	A1	25-11-2010
UY	27242	A1	31-07-2002
UY	27243	A1	30-09-2002
WO	02081496	A2	17-10-2002
WO	02081661	A2	17-10-2002
ZA	200307585	A	16-09-2004
ZA	200307679	A	03-01-2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CU2012/000007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61P35/00 C07K16/28 C07K16/42 A61K39/00 A61K39/395
 ADD.

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)

C07K 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)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 586 002 A2 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU] CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CH]) 9 March 1994 (1994-03-09) page 5, lines 1-34 page 11, lines 27-34 example 5	1-23
A	EP 1 798 243 A2 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU]) 20 June 2007 (2007-06-20) the whole document ----- -/--	1-23



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 application or patent 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 such 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

14 February 2013

Date of mailing of the international search report

25/03/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Covone-van Hees, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CU2012/000007

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEIS F M ET AL: "Regulation of epidermal growth factor receptor signal transduction. Role of gangliosides.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 15 JUL 1990, vol. 265, no. 20, 15 July 1990 (1990-07-15), pages 12059-12066, XP002691996, ISSN: 0021-9258 the whole document -----	1-23
A	HANAI N ET AL: "A novel ganglioside, de-N-acetyl-GM3 (II3NeuNH2LacCer), acting as a strong promoter for epidermal growth factor receptor kinase and as a stimulator for cell growth.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 5 MAY 1988, vol. 263, no. 13, 5 May 1988 (1988-05-05), pages 6296-6301, XP002691997, ISSN: 0021-9258 the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2012/000007

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0586002	A2	09-03-1994	AT	188874 T		15-02-2000
			DE	69327620 D1		24-02-2000
			DE	69327620 T2		03-08-2000
			DK	0586002 T3		19-06-2000
			EP	0586002 A2		09-03-1994
			ES	2144440 T3		16-06-2000
			GR	3033290 T3		29-09-2000
			PT	586002 E		31-07-2000

EP 1798243	A2	20-06-2007	AR	033122 A1		03-12-2003
			AR	033123 A1		03-12-2003
			AT	378356 T		15-11-2007
			AT	406386 T		15-09-2008
			AT	477279 T		15-08-2010
			AU	2002308347 B2		14-09-2006
			AU	2007231687 A1		22-11-2007
			BG	108227 A		30-04-2005
			BG	108228 A		30-04-2005
			BR	0208675 A		03-08-2004
			BR	0208676 A		08-04-2008
			CA	2441845 A1		17-10-2002
			CA	2443372 A1		17-10-2002
			CN	1507452 A		23-06-2004
			CN	1535282 A		06-10-2004
			CN	101054417 A		17-10-2007
			CU	23007 A1		17-12-2004
			CZ	20032641 A3		14-07-2004
			CZ	20032668 A3		14-07-2004
			DE	60223547 T2		18-09-2008
			DK	1384726 T3		15-12-2008
			DK	1411064 T3		25-03-2008
			EC	SP034787 A		28-01-2004
			EC	SP034788 A		28-01-2004
			EP	1384726 A2		28-01-2004
			EP	1411064 A2		21-04-2004
			EP	1798243 A2		20-06-2007
			ES	2296986 T3		01-05-2008
			ES	2312610 T3		01-03-2009
			HK	1066818 A1		07-12-2007
			HK	1070080 A1		04-07-2008
			HR	P20030805 A2		31-08-2005
			HR	P20030806 A2		31-08-2005
			HU	228105 B1		28-11-2012
			HU	0401355 A2		28-10-2004
			IL	158246 A		31-05-2010
			IS	6964 A		23-09-2003
			IS	6965 A		23-09-2003
			JP	4366080 B2		18-11-2009
			JP	2004525953 A		26-08-2004
			JP	2004528033 A		16-09-2004
			KR	20080080680 A		04-09-2008
			MX	PA03008738 A		11-12-2003
			MX	PA03008739 A		11-12-2003
			MY	137078 A		31-12-2008
			NO	20034436 A		02-12-2003
			NO	20034437 A		02-12-2003
			NZ	528598 A		24-03-2005
			NZ	528599 A		24-03-2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2012/000007

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PE 09722002 A1	02-01-2003
		PL 208109 B1	31-03-2011
		PT 1384726 E	05-12-2008
		PT 1411064 E	12-02-2008
		SG 161737 A1	29-06-2010
		SI 1384726 T1	30-04-2009
		SI 1411064 T1	30-04-2008
		SK 12162003 A3	04-05-2004
		SK 12262003 A3	03-08-2004
		UA 75393 C2	15-12-2003
		UA 76745 C2	15-12-2003
		US 2004253233 A1	16-12-2004
		US 2005069535 A1	31-03-2005
		US 2010297008 A1	25-11-2010
		UY 27242 A1	31-07-2002
		UY 27243 A1	30-09-2002
		WO 02081496 A2	17-10-2002
		WO 02081661 A2	17-10-2002
		ZA 200307585 A	16-09-2004
		ZA 200307679 A	03-01-2005

FIGURA 1

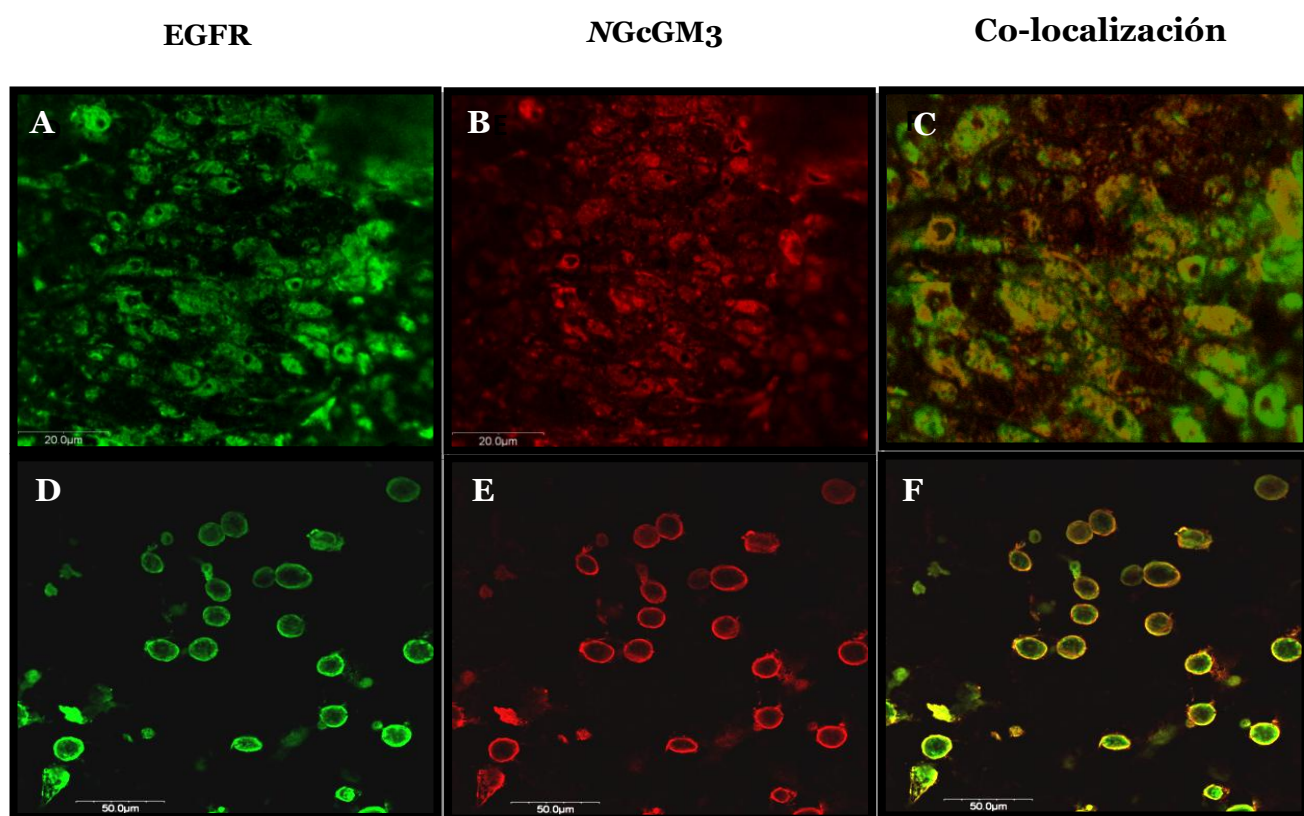


FIGURA 2

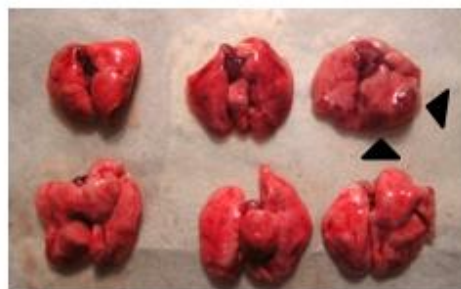
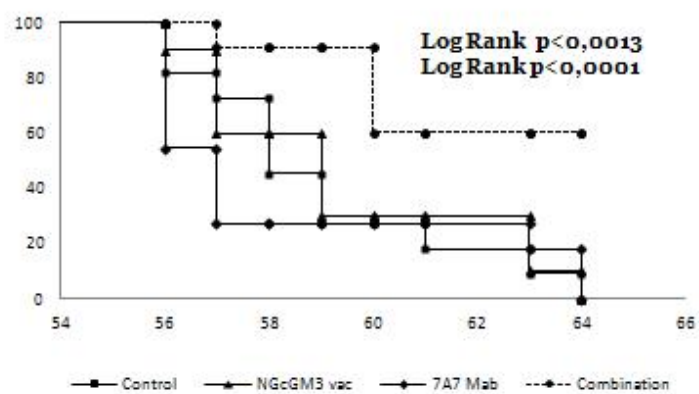


FIGURA 3.

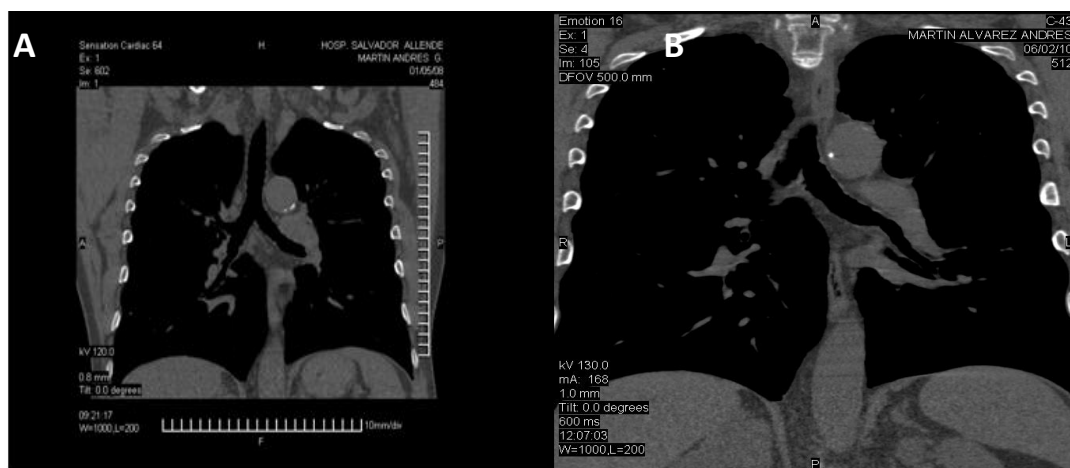
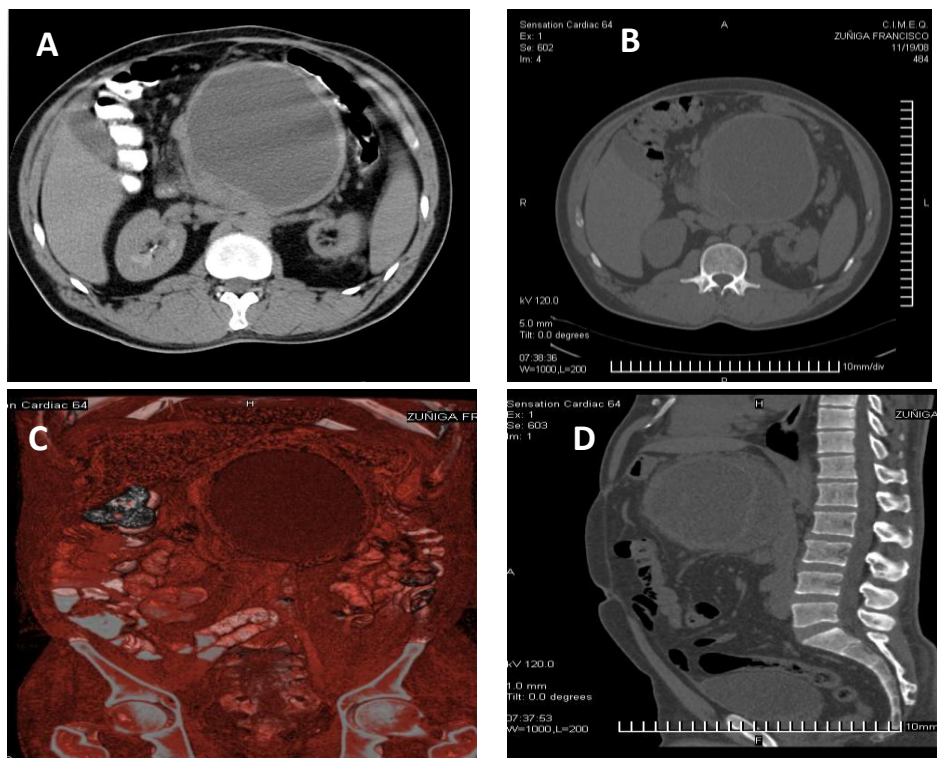


FIGURA 4



PODER

El (los)

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

Domiciliados en

Calle 216 Esq 15Atabey, Playa La Habana 11600, Cuba

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

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

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de registros sanitarios;
- c) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- d) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

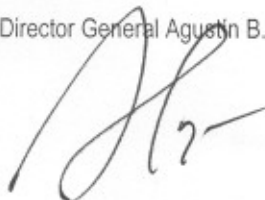
Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 05 de diciembre de 2012

En la Habana.

Por el Director General Agustín B. Lage Davila.



CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

Of

Calle 216 Esq 15Atabey, Playa La Habana 11600, Cuba

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia,

obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for

which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of Sanitary registrations;
- c) For the obtainment of copyright registrations
- d) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this

in

by

RESUMEN

La presente invención se refiere, a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores malignos. Particularmente aquellos tumores que expresan los blancos REGF y gangliósido *N*-glicolil GM3 con el fin de potenciar el efecto terapéutico que producen las terapias contra dichos blancos por separado. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden anticuerpos y/o vacunas contra cada uno de los blancos. Adicionalmente la presente invención se refiere a los métodos para la aplicación de las composiciones de la invención.