

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 963**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2003 E 03757931 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1549344**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas dirigidas a receptores Erb-B1**

30 Prioridad:

10.10.2002 EP 02022390

10.10.2002 EP 02022389

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.04.2015

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**KREYSCH, HANS-GEORG y
SCHMIDT, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 533 963 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas dirigidas a receptores ERB-B1

Área de la invención

5 La presente invención hace referencia a composiciones farmacéuticas que comprenden diferentes anticuerpos monoclonales, donde cada uno comprende epítomos que se unen simultáneamente a diferentes epítomos del mismo dominio del receptor ErbB1, en donde estos anticuerpos son MAb 425 humanizado y MAb 225 quimérico. La invención hace referencia a su uso para un tratamiento mejorado de tumores mediante dichas composiciones.

Antecedentes de la invención

10 Se sabe que moléculas biológicas, tales como anticuerpos monoclonales (MAbs) u otras proteínas / polipéptidos, además de pequeños compuestos químicos dirigidos contra diversos receptores y otros antígenos en la superficie de células tumorales son adecuados para la terapia tumoral desde hace más de veinte años. Con respecto a la aproximación con anticuerpos, la mayoría de estos MAbs están quimerizados o humanizados para mejorar la tolerabilidad con el sistema inmunológico humano. Los MAbs o las entidades químicas mencionadas anteriormente, se unen de manera específica a sus estructuras diana en las células tumorales y en la mayoría de los casos, también en los tejidos normales, y pueden causar diferentes efectos que dependen de la especificidad de sus epítomos y/o de las características funcionales del antígeno en particular. Se esperaría que los MAbs hacia los receptores huérfanos u otras moléculas de la superficie celular no funcionales, además de los MAbs contra estructuras por fuera del sitio de unión al ligando de receptores de funcionalidad activa (por ejemplo, receptores de factores de crecimiento con actividad quinasa), indujeran principalmente funciones efectoras inmunes contra la célula diana (citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC, por sus siglas en inglés), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)). Adicionalmente, dependiendo de las propiedades del antígeno y MAb, la unión del anticuerpo puede dar como resultado el entrecruzamiento de los receptores. La consecuente internalización de los complejos receptor-anticuerpo puede dar como resultado una modulación por disminución de la densidad del receptor en la superficie celular.

25 Los MAbs o compuestos químicos pequeños que se unen a un epítomo dentro del sitio de unión al ligando o en sus alrededores directos, compiten por la unión de ligandos naturales a su receptor, y por tanto inhiben la unión del ligando y pueden desplazar ligandos ya unidos de sus receptores. Este bloqueo del receptor inhibe la activación del receptor dependiente del ligando y la señalización aguas abajo. Por ejemplo, el bloqueo de los receptores ErbB, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mediante anticuerpos monoclonales da como resultado diversos efectos celulares que incluyen la inhibición de la síntesis y la proliferación de ADN, inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis, además de efectos antimetastásicos y antiangiogénicos.

35 Los receptores ErbB son receptores típicos de las tirosina quinasa que se implicaron en el cáncer en los años 80. Las tirosina quinasa son una clase de enzimas que catalizan la transferencia del fosfato terminal de adenosín-trifosfato a los residuos de tirosina en sustratos de proteínas. Se cree que las tirosina quinasa, mediante la fosforilación del sustrato, desempeña un papel de vital importancia en la transducción de señales para una serie de funciones celulares. Aunque los mecanismos exactos de la transducción de señales no están del todo claro aún, las tirosina quinasa han demostrado ser factores de contribución importante en la proliferación celular, la carcinogénesis y la diferenciación celular. Las tirosina quinasa pueden ser categorizadas como de tipo receptor o de tipo no receptor. Tanto las tirosina quinasa de tipo receptor como las no receptoras, están implicadas en las vías de señalización celular que conducen a numerosas condiciones patógenas, incluyendo el cáncer, psoriasis y las respuestas hiperinmunes. Muchas tirosina quinasa están implicadas en el crecimiento celular además de en la angiogénesis. El tipo no receptor de las tirosina quinasa está además compuesto por numerosas subfamilias, incluyendo Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, y LIMK. Cada una de estas subfamilias se subdivide además en diversos receptores. Por ejemplo, la subfamilia Src es una de las mayores e incluye Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr, y Yrk. La subfamilia Src de las enzimas ha estado ligada a la oncogénesis. Para una discusión más detallada del tipo no receptor de tirosina quinasa ver Bolen Oncogene, 8:2025-2031 (1993).

45 Las tirosina quinasa de tipo receptor tienen una parte extracelular, transmembrana e intracelular, mientras que las tirosina quinasa de tipo no receptor son completamente intracelulares. Las tirosina quinasa ligadas a receptor son proteínas transmembrana que contienen un dominio de unión a ligando extracelular, una secuencia transmembrana, y un dominio de tirosina quinasa citoplasmático. Las tirosina quinasa de tipo receptor están compuestas de un gran número de receptores transmembrana con actividad biológica diversa.

55 Se han identificado diferentes sub-familias de las tirosina quinasa de tipo receptor. Las tirosina quinasa implicadas incluyen receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de la familia de la clase principal de ErbB, y receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). También están implicados los receptores del Factor de crecimiento nervioso (NGF), receptores del Factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y receptores de neurotrofina-3 (NT-3), y receptores de neurotrofina-4 (NT-4).

Una subfamilia de tirosina quinasas de tipo receptor, denominada subfamilia HER o ErbB, consta de EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2 o p185neu), HER3 (ErbB3), y HER4(ErbB4). Los ligandos de esta subfamilia de receptores incluyen el factor de crecimiento epitelial (EGF), TGF- α , anfiregulina, HB-EGF, betacelulina, heregulina y neuregulinas. La subfamilia PDGF incluye la familia FLK que consta del receptor del dominio de inserción de quinasa (KDR).

El EGFR, codificado por el gen de *erbB1*, ha estado causalmente implicados en la malignidad en humanos. En particular, se ha observado una expresión aumentada de EGFR en el cáncer de mama, vejiga, pulmón, cabeza, cuello y estómago, además de en glioblastomas. La expresión aumentada del receptor de EGFR se asocia a menudo con la producción aumentada del ligando de EGFR, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), por parte de las mismas células tumorales, lo que da como resultado la activación del receptor por una vía estimuladora autocrina (Baselga y Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)). El receptor de EGF es una glicoproteína transmembrana que tiene un peso molecular de 170.000, y se encuentra en muchos tipos de células epiteliales. Se activa mediante al menos tres ligandos, EGF, TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa) y anfiregulina. Se ha demostrado que tanto el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) se unen a receptor de EGF y conducen a la proliferación celular y al crecimiento tumoral. Estos factores de crecimiento no se unen a HER2 (Ulrich y Schlesinger, 1990, *Cell* 61, 203). Al contrario que diversas familias de factores de crecimiento que inducen la dimerización del receptor en virtud de su naturaleza dimerica (por ejemplo PDGF), los factores de crecimiento monoméricos, tales como el EGF, contienen dos sitios de unión para sus receptores y, por lo tanto, podrían principalmente entrecruzar dos receptores de EGF próximos (Lemmon et al., 1997, *EMBO J.* 16, 281). Estudios recientes (J. Schlessinger, 2002, *Cell* 110, 669) muestran que la dimerización del receptor es mediada por interacciones receptor-receptor en las que un bucle que sobresale de los receptores cercanos actúa como mediador en la dimerización y activación del receptor.

La dimerización del receptor es esencial para la estimulación de la actividad catalítica intrínseca y para la auto fosforilación de receptores de factores de crecimiento en los residuos de tirosina. Estos últimos se utilizan como sitio de acoplamiento para diversas proteínas o enzimas adaptadoras, que simultáneamente inician muchas cascadas de señales. En eucariotas superiores, la vía lineal simple ha evolucionado hacia una red sumamente interactiva, de múltiples capas en la que la expresión y la activación combinatoria de componentes permiten respuestas biológicas específicas al contexto durante todo el desarrollo. La red de ErbB podría integrar no sólo sus propias entradas de señalización sino también señales heterólogas, incluyendo hormonas, linfocinas, neurotransmisores e inductores de estrés.

Debe señalarse que las proteínas tirosina quinasas receptoras (PTKs) son capaces de experimentar tanto homodimerización, en donde las combinaciones de receptores homodiméricos son menos mitogénicas y transformantes (ninguna o débil iniciación de señalización), que las correspondientes combinaciones heterodiméricas. Los heterodímeros que contienen ErbB2 son los complejos más potentes (ver artículos de revisión por Yarden y Sliwkowski, 2001, *Nature Reviews, Molecular cell Biology*, volume 2, 127 - 137; Tzahar y Yarden, 1998, *BBA* 1377, M25-M37).

Ha sido demostrado que los anticuerpos anti- receptor del EGF aunque bloquean el EGF y la unión del TGF- α al receptor, parecen inhibir la proliferación de células tumorales. En vista de estos descubrimientos, una serie de anticuerpos monoclonales murinos y de rata contra el receptor del EGF se han desarrollado y sometido a prueba para su habilidad para inhibir el crecimiento de células tumorales in vitro e in vivo (Modjtahedi y Dean, 1994, *J. Oncology* 4, 277). El anticuerpo monoclonal humanizado 425 (hMAb 425, US 5.558.864; EP 0531 472) y el anticuerpo monoclonal quimérico 225 (cMAb 225), ambos dirigidos al receptor del EGF, han demostrado su eficacia en ensayos clínicos. Se demostró que el anticuerpo C225 (Cetuximab) inhibe el crecimiento tumoral mediado por EGF in vitro, e inhibe la formación de tumores humanos in vivo en ratones desnudos. El anticuerpo además de en general todos los anticuerpos anti-EGFR, parecen actuar, por encima de todo, en sinergia con ciertos agentes quimioterapéuticos (es decir, doxorubicina, adriamicina, taxol, y cisplatino) para erradicar tumores humanos in vivo en modelos de xenotrasplante en ratón (ver, por ejemplo, EP 0667165). Ye et al. (1999, *Oncogene* 18, 731) han informado acerca de que las células del cáncer de ovario pueden ser tratadas con éxito con una combinación de tanto MAb 225 quimérico como MAb 4D5 humanizado que está dirigido al receptor de HER2.

El segundo miembro de la familia de ErbB, HER2 (ErbB2 o p185neu), se identificó originalmente como el producto del gen transformante procedente de neuroblastomas de ratas tratadas químicamente. La forma activada del protooncogén neu es el resultado de una mutación puntual (valina a ácido glutámico) en la región transmembrana de la proteína codificada. La amplificación del homólogo humano de *neu* se observa en el cáncer de ovario y de mama y se correlaciona con una prognosis deficiente (Slamon et al., *Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-7 12 (1989); US 4.968.603). El ErbB2 (HER2) tiene un peso molecular de aproximadamente 185.000, con una homología considerable al receptor de EGF (HER1), aunque hasta ahora no se ha identificado claramente todavía un ligando específico para HER2. Se encontró además que el anticuerpo 4D5 dirigido al receptor de HER2, hace sensibles las líneas de células tumorales de mama que sobreexpresan el ErbB2 a los efectos citotóxicos del

TNF α (US 5.677.171). Una versión recombinante humanizada del anticuerpo 4D5 anti-ErbB2 murino (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 o HERCEPTIN®; US 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con tipos de cáncer de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2 que han recibido previamente una extensa terapia anti cancerígena (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996)). HERCEPTIN® recibió la aprobación de comercialización en 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína ErbB2.

Además de los anticuerpos anti-ErbB, existen numerosas pequeñas moléculas químicas que se sabe son potentes inhibidores de las moléculas del receptor ErbB bloqueando el sitio de unión de los ligandos naturales (ver la descripción detallada), o bloqueando los residuos de tirosina del sitio de unión de la quinasa receptora, evitando de este modo la fosforilación y más cascadas de señales. Un caso representativo que muestra alta eficacia en ensayos clínicos es Iressa™ (ZD-1839) que puede ser aplicado para una indicación de CPNM (cáncer de pulmón no microcítico o de células pequeñas).

Modjtahedi et al., 1993, Cell Biophysics, 22, 129-146 revelan una combinación de diferentes anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, ICR61 y ICR62) que se unen a diferentes epítomos del EGFR humano. Dicha combinación de anticuerpos no mostraron un aumento del efecto de crecimiento tumoral en células tumorales específicas, mientras que sólo un anticuerpo (ICR62) causa el tratamiento más efectivo.

Aunque existen ya algunos fármacos y métodos de tratamiento en desarrollo y en el mercado prometedores, existe una continua necesidad de agentes y composiciones farmacéuticas adicionales, y combinaciones con propiedades mejoradas y eficacia aumentada.

Resumen de la invención

La invención se basa en la observación de los inventores de que las moléculas del receptor ErbB1 (EGFR), que están sobreexpresadas en las superficies de células afectadas, por ejemplo en células tumorales, tienen sitios de epítomos específicos dentro del dominio de unión del ligando natural al que diferentes moléculas de anticuerpos específicos pueden estar unidas sin o únicamente con un insignificante impedimento mutuo. Evidentemente, estas moléculas de anticuerpos poseen epítomos de unión que son, con respecto a su configuración tridimensional, relativamente pequeños, en comparación con el tamaño total del dominio de unión de la molécula del receptor. Inducen una actividad de modulación incrementada de la vía de señalización, preferiblemente un aumento en el bloqueo del receptor ErbB y, por tanto, de la cascada de señales completa. Los dos anticuerpos anti-EGFR diferentes según la invención son MAb 425, en una versión humanizada, y MAb 225, en una versión quimérica.

Se observó que las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden afectar al aumento de entrecruzamiento / dimerización de receptores de EGF diferentes o idénticos, al aumento de bloqueo / inhibición de los receptores de EGF, y al aumento de la inducción de la modulación de la vía de señalización específica al receptor de EGF, en comparación con una única molécula que comprende únicamente uno de dichos sitios de unión. En otras palabras: una mezcla de MAb 425 y MAb 225 genera el aumento en la inhibición y regulación por disminución del EGFR en comparación con los MAb 425 o 225 aplicados como un único agente en la misma concentración.

De manera opcional, la composición según la presente invención comprende además compuestos terapéuticamente activos que pueden afianzar y aumentar la eficacia de las moléculas mencionadas anteriormente. Tales agentes pueden ser agentes citotóxicos y preferiblemente moléculas antagonistas, tales como antagonistas de tirosina quinasa, otros antagonistas de ErbB, antagonistas del receptor del crecimiento hormonal, antagonistas de proteína quinasa, agentes anti-angiogénicos, o citocinas. Tales moléculas utilizables en la presente invención se especifican en mayor detalle a continuación.

De acuerdo con la presente invención, los agentes terapéuticamente activos pueden además ser proporcionados mediante un kit farmacéutico que comprende paquetes que contienen uno o más de dichos agentes antagonistas en envases únicos o individuales. La terapia con estas combinaciones puede incluir opcionalmente tratamiento con radiación. Principalmente, la administración puede ir acompañada de terapia con radiación, en donde el tratamiento con radiación pueda ser realizado, sustancialmente, de forma simultánea o después de la administración del fármaco. La administración de los diferentes agentes de la terapia de combinación de acuerdo con la invención, puede también llevarse a cabo, sustancialmente, de forma simultánea o secuencialmente. Los tumores, que llevan receptores en su superficie celular que están implicados en el desarrollo de los vasos sanguíneos del tumor, pueden ser tratados con éxito mediante la terapia de combinación de la presente invención.

Se conoce que los tumores generan vías alternativas para su desarrollo y crecimiento. Si una vía es bloqueada, a menudo tienen la capacidad de cambiar a otra vía expresando y utilizando otros receptores y vías de señalización. Por lo tanto, las combinaciones farmacéuticas de la presente invención pueden bloquear varias de tales estrategias de desarrollo posibles del tumor, y proporcionar consecuentemente varios beneficios. Las combinaciones de acuerdo con la presente invención son útiles en el tratamiento y la prevención de trastornos tumorales, similares a

tumores y neoplasia y en la metástasis tumoral, que se desarrollan y crecen por la activación de sus receptores hormonales relevantes que están presentes en la superficie de las células tumorales.

- 5 Preferiblemente, los dos anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados en combinación a una dosis baja, es decir, a una dosis inferior a las que han sido utilizadas convencionalmente en situaciones clínicas. Un beneficio de reducir la dosis de los compuestos, composiciones, agentes y terapias de la presente invención incluye una disminución en la incidencia de los efectos adversos asociados con dosis más elevadas. Por ejemplo, al reducir la dosis de un agente de los descritos anteriormente y más adelante, se obtendrá como resultado una reducción en la frecuencia y la gravedad de náuseas y vómitos, en comparación con lo observado a dosis más elevadas. Al reducir la incidencia de efectos adversos, se cuenta con una mejora en la calidad de vida de un paciente con cáncer.
- 10 Beneficios adicionales de reducir la incidencia de efectos adversos incluyen una mejora en la conformidad del paciente, una reducción en el número de hospitalizaciones necesarias para el tratamiento de los efectos adversos, y una reducción en la administración de agentes analgésicos necesarios para tratar el dolor asociado con los efectos adversos. De forma alternativa, los métodos y combinación de la presente invención pueden también maximizar el efecto terapéutico a dosis más elevadas.
- 15 La combinación de acuerdo con la invención muestra un efecto sinérgico asombroso. Al administrar la combinación de fármacos, se pudo observar una auténtica reducción y desintegración del tumor durante los estudios clínicos, mientras que no se detectaron reacciones adversas a los fármacos significativas.

Por tanto, la invención hace referencia a:

- 20 una composición farmacéutica que comprende una primera y una segunda molécula de anticuerpo, o una parte de la misma, donde cada una tiene la capacidad de unirse a diferentes epítopos situados en una molécula del receptor de EGF, en donde dicha primera molécula de anticuerpo o una parte de la misma comprende sitios de unión que se unen a un primer epítipo específico en la molécula del receptor de EGF, y dicha segunda molécula de anticuerpo comprende sitios de unión que se unen a un segundo epítipo específico diferente en dicha molécula del receptor de EGF, en donde
- 25 dicho primer y dicho segundo epítipo en la molécula del receptor de EGF está situado dentro del dominio de unión al receptor de EGF y en donde dicho primer anticuerpo es MAb 425 humanizado (h425) y dicho segundo anticuerpo es MAb 225 quimérico (c225). Una composición farmacéutica respectiva que comprende adicionalmente agente citotóxico.
- 30 Una composición farmacéutica respectiva, en donde dicho agente citotóxico es un agente quimioterapéutico, en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona de cualquiera de los compuestos del grupo: cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, bleomicina. Una composición farmacéutica respectiva, en donde dicho agente citotóxico es un inhibidor del receptor ErbB, un inhibidor del receptor VEGF, un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de la proteína quinasa A, un agente anti-angiogénico, o una citocina.
- 35 Un kit farmacéutico que comprende (i) un primer paquete que comprende una primera molécula de anticuerpo, o una parte de la misma, que comprende sitios de unión que se unen a un primer epítipo específico presente en una molécula del receptor de EGF, y (ii) un segundo paquete que comprende una segunda molécula de anticuerpo que comprende sitios de unión que se unen a un segundo epítipo específico diferente en la misma molécula del receptor de EGF, en donde
- 40 Dicho primer y segundo epítipo en el receptor de EGF está situado dentro del dominio de unión del receptor de EGF, y en donde dicha primera molécula de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal 425 humanizado, y dicha segunda molécula de anticuerpo es un anticuerpo monoclonal 225 quimérico. Una sustancia farmacéutica respectiva que comprende adicionalmente un tercer paquete que comprende un agente citotóxico, en donde
- 45 Dicho agente citotóxico es un agente quimioterapéutico, y en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona de cualquiera de los compuestos del grupo: cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, bleomicina.
- Un kit farmacéutico respectivo, en donde dicho fármaco citotóxico es un inhibidor del receptor ErbB, un inhibidor del receptor VEGF, un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de la proteína quinasa A, un agente anti-angiogénico, o una citocina.
- 50 El uso de una composición farmacéutica o un kit farmacéutico, según se define anteriormente y en cualquiera de las reivindicaciones, para su uso para el tratamiento de tumores sólidos y metástasis tumorales, que están relacionados con la sobreexpresión de los receptores ErbB1.

Descripción detallada de la revelación

Esta revelación está basada en la observación de que dos anticuerpos monoclonales (MAbs) con especificidades para diferentes estructuras inmunogénicas, pueden unirse al mismo tiempo y sin impedimento a sus epítomos, que pueden estar situados en el mismo dominio del receptor de EGF, por ejemplo dentro del dominio de unión al ligando de EGFR. La aplicación de dos anticuerpos anti-EGFR monoespecíficos dirigidos a diferentes epítomos en el receptor de EGF puede mejorar enormemente la eficacia terapéutica en comparación con la eficacia del tratamiento con únicamente un anticuerpo monoespecífico:

- Dichos MAb de acuerdo con la revelación se unen independientemente a diferentes epítomos en su receptor diana (por ejemplo EGFR).

- Debido a la unión independiente a diferentes epítomos de receptores, la cantidad de anticuerpo enlazado por receptor y por tanto por célula puede ser incrementado con la misma dosis o concentración de anticuerpo. Bajo condiciones óptimas con concentraciones o dosis de saturación para cada anticuerpo, el número de moléculas de anticuerpos enlazadas por receptor y por célula podría ser doblado teóricamente cuando se utilizan los dos anticuerpos contra diferentes epítomos.

- Las células con densidades de antígeno por debajo del umbral para funciones efectoras inmunes dependientes de anticuerpo, que no son vulnerables a terapias de anticuerpos bajo condiciones normales, presentan cantidades incrementadas de anticuerpo en su superficie después del tratamiento con dichos dos anticuerpos contra diferentes epítomos del mismo receptor y por tanto se vuelven potencialmente accesibles para ADCC y CDC.

- En comparación con la eficacia del bloqueo del receptor obtenido con únicamente un único anticuerpo, la aplicación de dichos dos anticuerpos monoespecíficos con especificidad para diferentes epítomos dentro o cerca del dominio de unión al ligando claramente aumenta la eficacia del bloqueo del receptor.

- Debido a que el bloqueo del receptor mediante la combinación de dichos diferentes anticuerpos contra el mismo dominio del receptor es más efectivo que el bloqueo del receptor mediante un único anticuerpo, se logra una inhibición de la unión al ligando más efectiva, lo que da como resultado una inactivación más efectiva del receptor.

- Esta activación más eficiente del receptor da como resultado una inhibición más efectiva de la señalización aguas abajo del receptor, y consecuentemente un aumento en el impacto sobre las funciones celulares dependientes del ligando.

- Debido al bloqueo más eficiente del receptor la dosis (o concentración) de cada uno de dichos anticuerpos puede ser reducida sin pérdida de eficacia. Esto puede ser de gran interés cuando dichos anticuerpos terapéuticos muestran toxicidades de limitación de dosis o efectos secundarios ya por debajo de su dosis terapéutica óptima.

- La formación de complejos más grandes de anticuerpo-receptor inducidas por la aplicación de dichos dos anticuerpos, mejora la internalización de los receptores, y por tanto son más eficientes para la eliminación de receptores de la superficie celular y la consecuente regulación por disminución de las funciones celulares dependientes del receptor.

Si no se señala de otro modo, los términos y frases utilizadas en la presente revelación tienen los significados y definiciones según se proporcionan a continuación. Más aún, estas definiciones y significados describen la invención en más detalle, con los modos de realización preferidos incluidos.

Un "receptor" o "molécula del receptor" es un enlace soluble o membrana / asociado a proteína o glucoproteína que comprende uno o más dominios a los que se une el ligando para formar un complejo ligando-receptor. Mediante la unión al ligando, que puede ser un agonista o un antagonista, el receptor es activado o inactivado y puede iniciar o bloquear la vía de señalización.

El término "tipo de molécula del receptor ErbB" o "tipo de molécula del receptor (ErbB1)" significa un tipo de receptor específico tal como ErbB1, ErbB2, etc., pero no una única molécula específica de este tipo de receptor. Si se establece en la presente patente que los anticuerpos de acuerdo con la revelación dentro de su combinación se unen a un tipo específico de molécula del receptor ErbB, esto no incluye la unión de los anticuerpos a las mismas o diferentes moléculas del mismo tipo de receptor ErbB, según se indica. Por tanto, es posible que el primer anticuerpo se una a un epítomo específico en una molécula del receptor ErbB1 individual, y el segundo anticuerpo se una a otro epítomo diferente de la misma molécula del receptor ErbB1 individual. Sin embargo, es posible también que el segundo anticuerpo se una al mismo epítomo diferente de otra molécula del receptor individual del mismo tipo de receptor.

Por "ligando" o "ligando del receptor" se entiende un compuesto natural o sintético que se une a una molécula del receptor para formar un complejo ligando-receptor. El término ligando incluye agonistas, antagonistas, y compuestos con acción parcial agonista/ antagonista.

Un “agonista” o “agonista del receptor” es un compuesto natural o sintético que se une al receptor para formar un complejo receptor-agonista mediante la activación de dicho receptor y complejo receptor-agonista, respectivamente, iniciando una vía de señalización y procesos biológicos adicionales.

5 Por “antagonista” o “antagonista del receptor” se entiende un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico opuesto al de un agonista. Un antagonista se une al receptor y bloquea la acción de un agonista del receptor compitiendo con el agonista por el receptor. Un antagonista se define por su habilidad para bloquear las acciones de un agonista. Un antagonista del receptor puede también ser un anticuerpo o un fragmento inmunoterapéuticamente efectivo del mismo. Antagonistas preferidos de acuerdo a la presente revelación se citan y se tratan más adelante.

10 Un “receptor ErbB” es una proteína tirosina quinasa receptora que pertenece, como se ha especificado ya anteriormente, a la familia de receptores ErbB e incluye los receptores de EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 y ErbB4 y otros miembros de esta familia a ser identificados en el futuro. El receptor ErbB comprenderá por lo general un dominio extracelular, que puede unirse a un ligando de ErbB; un dominio transmembrana lipofílico; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo terminal albergando diversos
15 residuos de tirosina que pueden ser fosforilados. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB de “secuencia nativa” o una “variante de aminoácidos” del mismo. Preferiblemente, el ErbB es un receptor ErbB humano de secuencia nativa. ErbB1 hace referencia al gen que codifica el producto proteico de EGFR. De mayor preferencia es el receptor de EGF (EGFR, HER1). Las expresiones “ErbB1” y “HER1” y “EGFR” se utilizan de modo intercambiable en la presente patente y hacen referencia a la proteína HER1 humana. Las expresiones “ErbB2” y “HER2” se utilizan de
20 forma intercambiable en la presente patente y hacen referencia a la proteína HER2 humana. Se prefieren los receptores ErbB1 (EGFR) de acuerdo a la presente revelación.

El “ligando de ErbB” es un polipéptido que se une a y/o activa un receptor ErbB. Los ligandos de ErbB que se unen a EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF-alfa, anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y epiregulina, preferiblemente EGF y TGF-alfa.

25 El “dominio de unión al receptor ErbB” es en el contexto de la presente revelación la región local (secuencia de unión / asa / cavidad) del receptor ErbB al que el ligando natural o un fármaco antagonista o agonista se une. Esta región puede comprender no solo un sitio de unión específico o epítipo, sino dos o más epítopos y sitios de unión, respectivamente. Un epítipo de unión específico dentro del dominio se une a un tipo de fármaco o ligando antagonista o agonista. No obstante, se considera que la unión de diferentes agentes a diferentes epítopos dentro
30 de o casi adyacentes al dominio de unión del mismo tipo de receptor causa, generalmente, mediante inhibición o activación, una distinta y única vía de señalización que es típica para dicho receptor. Más aún, debe señalarse que la frase “dentro del dominio de unión” utilizada en esta descripción y reivindicaciones incluye también localizaciones del respectivo ligando o ligandos naturales.

35 El “epítipo de unión a ErbB o sitio de unión a ErbB” significa una conformación y/o configuración de aminoácidos dentro o en zonas cercanas del dominio de unión de un receptor ErbB al que se unen antagonistas / agonistas de ligandos o del receptor.

La “misma molécula del receptor ErbB / ErbB1” significa no necesariamente la molécula del receptor idéntica, sino incluye también otra molécula de un receptor del mismo tipo. Preferiblemente, significa la molécula del receptor idéntica.

40 El término “antagonista / inhibidor del receptor ErbB” hace referencia a una molécula biológicamente efectiva, que se une a y bloquea o inhibe el receptor ErbB. Por tanto, bloquear el antagonista del receptor evita la unión del ligando de ErbB (agonista) y la activación del complejo del receptor agonista / ligando. Los antagonistas de ErbB pueden estar dirigidos a HER1 (ErbB1, EGFR), HER2 (ErbB2) y ErbB3 y ErbB4. Los antagonistas preferidos de la revelación están dirigidos al receptor de EGF (EGFR, HER1). El antagonista del receptor de ErbB puede ser un anticuerpo o un
45 fragmento terapéuticamente efectivo del mismo o moléculas no inmunobiológicas, tales como una proteína peptídica, polipeptídica. Las moléculas químicas están también incluidas, sin embargo, los anticuerpos anti-EGFR y anti-HER2 son los antagonistas preferidos de acuerdo a la presente revelación.

Los anticuerpos preferidos de la revelación son los anticuerpos anti-Her1 y anti-Her2, más preferiblemente anticuerpos anti-Her1. Los anticuerpos preferidos anti-Her1 son MAb 425, preferiblemente MAb 425 humanizado
50 (hMAb 425, US 5.558.864; EP 0531 472) y MAb 225 quimérico (CETUXIMAB®). El de mayor preferencia es el anticuerpo monoclonal h425, que ha mostrado una alta eficacia en terapia monofármaco combinada con efectos adversos y secundarios reducidos. El anticuerpo anti-HER2 de mayor preferencia es HERCEPTIN® comercializado por Genentech/Roche. Los antagonistas del receptor de EGF según la revelación pueden ser además compuestos químicos naturales o sintéticos. Algunos ejemplos de moléculas preferidas de esta categoría incluyen compuestos
55 orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y organometálicos. Ejemplos de antagonistas del receptor de HER2 son: compuestos de heteroarilo sustituido con estirilo (US 5.656.655); compuestos de arilo y/o heteroarilo bis mono y/o bicíclico, (US 5.646.153); compuestos de pirimidina tricíclicos (US

5.679.683); derivados de quinazolina que tienen actividad inhibidora de tirosina quinasa receptora (US 5.616.582); compuestos de heteroaril-etenodilo o heteroaril-etenodilarilo (US 5.196.446); un compuesto denominado como 6-(2,6-diclorofenil)-2-(4-(2-dietil-aminoetoxi) fenilamino)-8-metil-8H-pirido(2,3)-5-pirimidin-7-ona (Panek, et al., 1997, J. Pharmacol. Exp. Therap. 283,1433) que inhiben las familias de receptores EGFR, PDGFR, y FGFR.

5 El término "*inhibidor/antagonista de tirosina quinasa*" hace referencia según la presente revelación a agentes naturales o sintéticos que están capacitados para inhibir o bloquear las tirosina quinasa, incluidas las tirosina quinasa receptoras. Por tanto, el término incluye per se los inhibidores / antagonistas del receptor ErbB según se define anteriormente. Con excepción de los anticuerpos del receptor anti-ErbB mencionado anteriormente y más adelante, los agentes antagonistas de tirosina quinasa de más preferencia bajo esta definición son compuestos
10 químicos que han mostrado eficacia en la terapia monofármaco para el cáncer de mama y próstata. Los inhibidores adecuados de tirosina quinasa de tipo indolocarbazol puede ser obtenida utilizando información que se encuentra en documentos tales como las patentes estadounidenses 5.516.771; 5.654.427; 5.461.146; 5.650.407. Las patentes estadounidenses 5.475.110; 5.591.855; 5.594.009 y WO 96/11933 revelan inhibidores de tirosina quinasa tipo pirrolocarbazol y cáncer de próstata. Uno de los más prometedores agentes anti-cancerígenos en este contexto es el gefitinib (IRESSA®, Astra Zeneca), sobre el que se ha informado que posee una eficacia terapéutica excepcional y una tolerabilidad en pacientes excelente con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) además de con el cáncer de cabeza y cuello avanzado.

Preferiblemente, la dosis de los inhibidores de tirosina quinasa según se define anteriormente es de 1 pg/kg a 1 g/kg de peso corporal por día. Más preferiblemente, la dosis de los inhibidores de tirosina quinasa es de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal por día.

En este contexto, el término "*anticuerpo*" o "*inmunoglobulina*" en la presente patente se utiliza en el más amplio sentido y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. El término generalmente incluye heteroanticuerpos que están compuestos de dos o más anticuerpos o fragmentos de los mismos de diferente especificidad de unión que están enlazados entre sí.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de sus regiones constantes, los anticuerpos intactos pueden ser asignados a diferentes "*clases de anticuerpos (inmunoglobulinas)*". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varios de estos pueden ser divididos adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ y μ respectivamente. La clase principal preferida de anticuerpos según la presente revelación es el IgG, en más detalle IgG1 e IgG2.

Los anticuerpos normalmente son glicoproteínas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, mientras que el número de puentes disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera tiene también regularmente puentes disulfuro distanciados entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número constante de dominios. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos en particular forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie de vertebrados pueden ser asignadas a uno o dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

45 El término "*anticuerpo monoclonal*" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que pueden ser sintetizados sin estar contaminados por otros anticuerpos. Métodos para realizar anticuerpos monoclonales incluyen el método del hibridoma descrito por by Kohler y Milstein (1975, Nature 256, 495) y en "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" (1985, Burdon et al., Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volumen 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam), o pueden ser fabricados mediante métodos de ADN recombinante bien conocidos (ver por ejemplo, US 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados de las genotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991), por ejemplo.

- El término "*anticuerpo quimérico*" significa anticuerpos en los que una parte de la cadena pesada y/o cadena ligera es idéntica a o homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo en particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas a o homólogas a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (por ejemplo: US 4.816.567; Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Métodos para realizar anticuerpos quiméricos y humanizados se conocen también en el arte. Por ejemplo, métodos para realizar anticuerpos quiméricos incluyen los descritos en patentes por Boss (Celltech) y por Cabilly (Genentech) (US 4.816.397; US 4.816.567).
- Los "*anticuerpos humanizados*" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región hipervariable (CDRs) del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región armazón (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante.
- Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las asas hipervariables se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. En Winter (US 5.225.539) y Boss (Celltech, US 4.816.397) se describen métodos para producir anticuerpos humanizados.
- El término "*monoespecífico*" hace referencia a anticuerpos de acuerdo con la presente revelación, en donde los dos sitios de unión del anticuerpo tienen la misma especificidad, siendo de este modo capaces de unirse al mismo epítipo en el receptor. Preferiblemente, de acuerdo con la presente invención, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos monoespecíficos.
- El término "*citocina*" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otras células como mediadores intercelulares. Ejemplos de estas citocinas son las linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen las hormonas del crecimiento, tales como la hormona del crecimiento humano, hormona de crecimiento humano N-metililo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteicas tales como la hormona foliculo estimulante (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); integrina; trombotopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGFβ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGFα y TGFβ; eritropoyetina (EPO); interferones como IFNα, IFNβ e IFNγ; factores estimulantes de colonias como M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; y TNFα o TNFβ. Las citocinas preferidas según la invención son los interferones, el TNFα y la IL-2.
- El término "*ADCC*" (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos), hace referencia a una reacción mediada por la célula en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos), reconocen el anticuerpo enlazado en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para la mediación en ADCC, las células NK, expresan únicamente FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC in vitro, tal como el descrito en el arte previo (US 5.500.362; US 5.821.337). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK).
- Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se utilizan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas con empalme alternativo de estos receptores. Los FcR se analizan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991).
- La aproximación terapéutica de la presente revelación incluye como un aspecto específico el uso de agentes terapéuticamente efectivos adicionales, que soportan el efecto deseado, por ejemplo toxicidad tumoral o eficacia citostática, o disminuyen o evitan efectos secundarios no deseados. Por tanto, la revelación incluye la combinación de tales agentes con la composición farmacéutica definida y reivindicada anteriormente y más adelante, en donde

dichos agentes pueden ser otros antagonistas del receptor ErbB, antagonistas del receptor VEGF, citocinas, inmunoconjugados de citocinas, agentes anti-angiogénicos, agentes anti-hormonales, o agentes citotóxicos en general. Es también un objeto de la presente revelación combinar las composiciones según se definen en la presente patente con radioterapia de acuerdo con métodos conocidos.

5 El término “*agente citotóxico*” según se usa en este contexto se define muy ampliamente y hace referencia a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y / o causa la destrucción de las células (muerte celular), y / o ejerce efectos antineoplásicos / anti-proliferativos, por ejemplo, evita directa o indirectamente el desarrollo, maduración o propagación de las células tumorales neoplásicas. El término incluye expresamente también tales agentes que causan únicamente un efecto citostático y no un simple efecto citotóxico.

10 El término incluye agentes quimioterapéuticos según se especifica a continuación, además de otros antagonistas de ErbB (tales como anticuerpos anti-ErbB), agentes anti-angiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de proteína quinasa A, miembros de la familia de citocinas, isótopos radiactivos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal.

15 El término “*agente quimioterapéutico*” es un subconjunto del término “*agente citotóxico*” y significa específicamente agentes químicos que ejercen efectos antineoplásicos, preferiblemente directamente en la célula tumoral, y de manera menos preferida indirectamente a través de mecanismos tales como la modificación de la respuesta biológica. Los agentes quimioterapéuticos adecuados según la revelación son, preferiblemente, compuestos químicos naturales o sintéticos. Hay un gran número de agentes químicos antineoplásicos disponibles para su uso comercial, en evaluación clínica y en desarrollo preclínico, que podrían incluirse en la presente revelación para el tratamiento de tumores / neoplasias mediante terapia de combinación con los antagonistas del receptor según se reivindica en la presente revelación. Cabe destacar que los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse opcionalmente junto con dichos antagonistas del receptor ErbB, preferiblemente dichos anticuerpos anti-EGFR, de acuerdo con la revelación.

25 Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas nitrogenadas, compuestos de etilenimina, sulfonatos de alquilo y otros compuestos con acción alquilante tales como nitrosoureas, cisplatino y dacarbazina; antimetabolitos, por ejemplo, ácido fólico, antagonistas de purinas o de pirimidinas; inhibidores mitóticos, por ejemplo, alcaloides de la vinca y derivados de podofilotoxina; antibióticos citotóxicos y derivados de camptotecina.

30 Entre los agentes quimioterapéuticos se encuentran amifostina (etiol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza nitrogenada), estreptozocina, ciclofosfamida, carnustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo (doxil), gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, daunorrubicina lipo (daunoxoma), procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleuquina, asparraginasas, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-captotecina (SN38), gefitinib (Iressa), dacarbazina, floxuridina, fludarebina, hidroxurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprólido, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenopósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo y combinaciones de los mismos.

40 Los agentes quimioterapéuticos de mayor preferencia según la revelación son cisplatino, gemcitabina, doxorubicina, paclitaxel (taxol) y bleomicina.

45 Un “*agente anti-angiogénico*” hace referencia a un compuesto natural o sintético que bloquea, o interfiere con, en cierto grado, el desarrollo de los vasos sanguíneos. La molécula anti-angiogénica puede, por ejemplo, ser una molécula biológica que se une y que bloquea un factor de crecimiento angiogénico o un receptor de un factor de crecimiento. La molécula anti-angiogénica preferida en la presente patente, se une a un receptor, preferiblemente a un receptor de integrinas o a un receptor de VEGF. El término incluye, de acuerdo con la presente revelación, además un profármaco de dicho agente angiogénico. El término además incluye agentes efectivos según se describe y además clasificados como citotóxicos, preferiblemente, agentes quimioterapéuticos.

50 Existe un gran número de moléculas que tienen diferente estructura y origen que generan propiedades anti-angiogénicas. Las clases más relevantes de agentes de inhibición o bloqueo de la angiogénesis que son adecuados en la presente revelación son, por ejemplo:

(i) *Anti-mitóticos* tales como flurouracilo, mitomicina-C, taxol;

(ii) *Metabolitos de estrógenos* tales como 2-metoxiestradiol;

(iii) *Inhibidores de metaloproteinasas de matriz (MMP)*, que inhiben metaloproteasas de metaloproteinasas dependientes de zinc, (por ejemplo, betimastat, BB16, TIMPs, minociclina, GM6001, o aquellas descritas en "Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Applications" (Golub, Annals of the New York Academy of Science, Vol. 878a; Greenwald, Zucker (Eds.), 1999);

5 (iv) *agentes y factores multi-funcionales anti-angiogénicos* tales como IFN α (US 4.530.901; US 4.503.035; 5.231.176); fragmentos de angiostatina y plasminógeno (por ejemplo, kringle 1-4, kringle 5, kringle 1-3 (O'Reilly, M. S. et al., Cell (Cambridge, Mass.) 79(2): 315-328, 1994; Cao et al., J. Biol. Chem. 271: 29461-29467, 1996; Cao et al., J. Biol. Chem 272: 22924 -22928, 1997); endostatina (O'Reilly, M. S. et al., Cell 88(2), 277, 1997 y WO 97/15666), trombospondina (TSP-1; Frazier, 1991, Curr Opin Cell Biol 3(5): 792); factor plaquetario 4 (PF4);

10 (v) *inhibidores de activador del plasminógeno/uroquinasa;*

(vi) *antagonistas del receptor de uroquinasa;*

(vii) *heparinasas,*

(viii) *análogos de fumagilina* tales como TNP-470;

15 (ix) *inhibidores de tirosina quinasa* tales como SU10. Muchos de los antagonistas del receptor ErbB anteriores y a continuación (antagonistas de EGFR / HER2) son además inhibidores de tirosina quinasa, y pueden mostrar, por lo tanto actividad de bloqueo del receptor anti-EGF que da como resultado la inhibición del crecimiento tumoral, además de actividad anti-angiogénica que da como resultado la inhibición del desarrollo de vasos sanguíneos y células endoteliales, respectivamente;

(x) *suramina y análogos de suramina;*

20 (xi) *esteroides angiostáticos;*

(xii) *antagonistas de VEGF y bFGF;*

(xiii) *antagonistas del receptor de VEGF – tales como anticuerpos del receptor anti-VEGF (DC-101);*

(xiv) *antagonistas de flk-1 yflt-1;*

(xv) *inhibidores de ciclooxigenasa-II* tales como COX-II;

25 (xvi) *antagonistas de integrina y antagonistas del receptor de integrina* tales como antagonistas α_v y antagonistas del receptor α_v , por ejemplo, anticuerpos del receptor anti- α_v y péptidos RGD. Se prefieren antagonistas de (receptor) integrina de acuerdo con la presente revelación. El término "antagonistas / inhibidores de integrina" o "antagonistas / inhibidores del receptor de integrina" hace referencia a una molécula natural o sintética que bloquea e inhibe un receptor de integrina. En algunos casos, el término incluye antagonistas dirigidos a los ligandos de dichos receptores de integrina (tales como para $\alpha_v\beta_3$: vitronectina, fibrina, fibrinógeno, factor de von Willebrand, trombospondina, laminina; para $\alpha_v\beta_5$: vitronectina; para $\alpha_v\beta_1$: fibronectina y vitronectina; para $\alpha_v\beta_6$: fibronectina).

30

Se prefieren antagonistas dirigidos a los receptores de integrina de acuerdo con la revelación. Los antagonistas de integrina (receptor), pueden ser péptidos naturales o sintéticos, no péptidos, peptidomiméticos, inmunoglobulinas, tales como anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, o inmunoconjugados (proteínas de fusión).

35 Los inhibidores de integrina preferidos de la revelación están dirigidos al receptor de integrinas α_v (por ejemplo, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ y sub-clases). Inhibidores preferidos de integrina son los antagonistas de α_v , en particular los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$. Antagonistas de α_v preferidos según la revelación son péptidos RGD, antagonistas de peptidomiméticos (no péptidos) y anticuerpos de receptor anti-integrina, tales como anticuerpos que bloquean receptores α_v . Ejemplos de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ no inmunológicos se describen en las descripciones de los documentos US 5.753.230 y US 5.766.591. Antagonistas preferidos son péptidos lineales y cíclicos que contienen RGD. Los péptidos cíclicos son, por norma, más estables y generan un aumento de la vida media en suero. El antagonista de integrina de mayor preferencia de la revelación es, sin embargo, ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) (EMD 121974, Cilengitide®, Merck KgaA, Alemania; EP 0770 622), que es eficaz en bloquear los receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_{11b}\beta_3$.

40

45 Antagonistas peptídicos además de peptidomiméticos (no péptidos) adecuados del receptor de integrinas $\alpha_v\beta_3$ / $\alpha_v\beta_5$ / $\alpha_v\beta_6$ han sido descritos tanto en la literatura de patentes como en la científica. Por ejemplo, se hace referencia a Hoekstra y Poulter, 1998, Curr. Med. Chem. 5, 195; WO 95/32710; WO 95/37655; WO 97/01540; WO 97/37655; WO 97/45137; WO 97/41844; WO 98/08840; WO 98/18460; WO 98/18461; WO 98/25892; WO 98/31359; WO 98/30542;

WO 99/15506; WO 99/15507; WO 99/31061; WO 00/06169; EP 0853 084; EP 0854 140; EP 0854 145; US 5.780.426; y US 6.048.861. Las patentes que han revelado los antagonistas del receptor de integrina $\alpha_v\beta_3$ benzacepina, además de las relacionadas benzodiazepina y benzociclohepteno, que son también adecuados para su uso en la presente revelación, incluyen WO 96/00574, WO 96/00730, WO 96/06087, WO 96/26190, WO 97/24119, WO 97/24122, WO 97/24124, WO 98/15278, WO 99/05107, WO 99/06049, WO 99/15170, WO 99/15178, WO 97/34865, WO 97/01540, WO 98/30542, WO 99/11626, y WO 99/15508. Otros antagonistas de receptores de integrina que presentan restricciones en el anillo conformacional de la estructura principal, han sido descritos en WO 98/08840; WO 99/30709; WO 99/30713; WO 99/31099; WO 00/09503; US 5.919.792; US 5.925.655; US 5.981.546; y US 6.017.926. En US 6.048.861 y WO 00/72801, se revelaron una serie de derivados del ácido nonanoico que son potentes antagonistas del receptor de la integrina $\alpha_v\beta_3$. Otros antagonistas de integrinas de molécula química pequeña (principalmente antagonistas de vitronectina), se describen en WO 00/38665. Otros antagonistas del receptor de $\alpha_v\beta_3$ se han mostrado efectivos en la inhibición de la angiogénesis. Por ejemplo, los antagonistas de receptor sintéticos, tales como el ácido (S)-10,11-Dihidro-3-[3-(piridin-2-ilamino)-1-propiloxi]-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-10-acético (conocido como SB-265123), han sido sometidos a ensayo en una variedad de sistemas de modelos mamíferos. (Keenan et al., 1998, Bioorg. Med. Chem. Lett. 8(22), 3171; Ward et al., 1999, Drug Metab. Dispos. 27(11),1232). Ensayos para la identificación de antagonistas de integrina adecuados para su uso como un antagonista se describen en, por ejemplo Smith et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 12267, y en la literatura de patentes a la que se ha hecho referencia. Los anticuerpos del receptor anti-integrinas son también bien conocidos. Anticuerpos monoclonales anti-integrina adecuados (por ejemplo, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$) pueden ser modificados para abarcar fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo F(ab)₂, Fab, y Fv modificado genéticamente o un anticuerpo de cadena única. Un anticuerpo monoclonal adecuado y preferiblemente utilizado, dirigido contra el receptor de integrina $\alpha_v\beta_3$, se identifica como LM609 (Brooks et al., 1994, Cell 79, 1157; ATCC HB 9537). Un potente anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_5$ específico P1F6, que es también preferido de acuerdo a la presente invención, se revela en WO 97/45447. Un anticuerpo selectivo para $\alpha_v\beta_6$ adicional adecuado es MAb 14D9.F8 (WO 99/37683, DSM ACC2331, Merck KGaA, Alemania), además de MAb 17.E6 (EP 0719 859, DSM ACC2160, Merck KGaA) que se dirige selectivamente a la cadena α_v de receptores de integrinas. Otro anticuerpo adecuado anti-integrina es el comercializado Vitraxin®.

Los términos “cáncer” y “tumor” hacen referencia a o describen la condición fisiológica en mamíferos que habitualmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Mediante las composiciones farmacéuticas según la presente descripción, pueden tratarse tumores como los tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga, cabeza y cuello, ovario, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos, cuello uterino e hígado. Más específicamente, el tumor se selecciona del grupo que consiste en adenoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hamartoma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma y teratoma. En detalle, el tumor se selecciona del grupo que consiste en melanoma lentiginoso acral, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartolino, carcinoma basocelular, carcinomas de glándulas broquiales, capilar, carcinoides, carcinoma, carcinosarcoma, del cuerpo cavernoso, colangiocarcinoma, condrosarcoma, papiloma/carcinoma del plexo coroideo, carcinoma de células claras, cistadenoma, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma estromal endometrial, adenocarcinoma endometroide, ependimario, epiteloide, sarcoma de Ewing, fibrolamelar, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de células germinales, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinoma, neoplasia intraepitelial, neoplasias de células escamosas interepiteliales, carcinoma de células escamosas invasivas, carcinoma de células grandes, leiomiomas, melanomas malignos lentiginosos, melanoma maligno, tumores mesoteliales malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, carcinoma meníngeo, mesotelial y metastásico, carcinoma mucoepidermoide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, carcinoma microcítico, oligodendrogial, osteosarcoma, polipéptido pancreático, adenocarcinoma papilar seroso, tumores de la célula pineal y de la pituitaria, plasmocitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células pequeñas, carcinomas de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, submesotelial, melanoma superficial difuso, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrucoso, vipoma, carcinoma bien diferenciado y tumor de Wilm.

Los tumores que pueden ser preferiblemente tratados con las moléculas de anticuerpos de acuerdo con la revelación son tumores sólidos o metástasis tumorales que expresan receptores ErbB, en especial receptores ErbB1, en grandes cantidades, tales como el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, SCLC, cáncer de páncreas.

El término “biológicamente/funcionalmente efectivo” o “terapéuticamente efectivo (cantidad)” hace referencia a un fármaco / molécula que causa una función biológica o un cambio de una función biológica in vivo o in vitro, y que es efectiva en una cantidad específica para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero, preferiblemente en un humano. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de

células cancerígenas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más síntomas asociados con el cáncer. Según el grado en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o matar las células cancerígenas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia contra el cáncer la eficacia puede medirse, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TPE) y/o determinando las tasas de respuesta (TR).

El término "inmunoterapéuticamente efectivo" hace referencia a moléculas biológicas que causan una respuesta inmune en un mamífero. Más específicamente, el término hace referencia a moléculas que pueden reconocer y unirse a un antígeno. Habitualmente, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos que comprenden sus sitios de unión al antígeno (regiones determinantes de complementariedad, CDRs), son inmunoterapéuticamente efectivos.

"*Tratamiento farmacéutico*". El método de la revelación comprende una variedad de modalidades para practicar la revelación en términos de etapas. Por ejemplo, los agentes de acuerdo con la revelación pueden ser administrados simultáneamente, secuencialmente, o por separado. Además, los agentes pueden ser administrados por separado dentro de un intervalo de tiempo de aproximadamente 3 semanas entre las administraciones, es decir, desde sustancialmente inmediatamente después de que se administre el primer agente activo hasta aproximadamente 3 semanas después de que el primer agente sea administrado. El método puede ser practicado siguiendo un procedimiento quirúrgico. De manera alternativa, el procedimiento quirúrgico puede ser practicado durante el intervalo entre la administración del primer agente activo y el segundo agente activo. Ejemplos de este método es la combinación del presente método con la extirpación quirúrgica del tumor. El tratamiento de acuerdo con el método comprenderá habitualmente la administración de las composiciones terapéuticas en uno o más ciclos de administración. Por ejemplo, cuando se practique una administración simultánea, una composición terapéutica que comprende ambos agentes se administra por un periodo de tiempo desde aproximadamente 2 días hasta 3 semanas en un único ciclo. Posteriormente, el ciclo de tratamiento puede repetirse según se necesite de acuerdo al juicio del médico. De igual manera, cuando se contemple una administración secuencial, el tiempo de administración para cada individuo terapéutico será ajustado para cubrir habitualmente el mismo periodo de tiempo. El intervalo entre ciclos puede variar desde aproximadamente cero a 2 meses.

Los agentes de la presente revelación pueden ser administrados por vía parenteral mediante inyección o mediante infusión gradual en el tiempo. Aunque se pueda acceder al tejido a ser tratado en el cuerpo mediante la administración sistémica y, por lo tanto, la mayoría de las veces tratarlo mediante administración por vía intravenosa de las composiciones terapéuticas, otros tejidos y medios de administración se contemplan cuando existe la probabilidad de que el tejido fijado como diana contenga la molécula diana. Por tanto, los agentes de la presente revelación pueden ser administrados por vía intraocular, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad, transdérmica, mediante inyección e infusión ortotópica, y puede también ser administrada por medios peristálticos. Las composiciones terapéuticas que contienen, por ejemplo, un antagonista de integrinas de la presente revelación se administran convencionalmente por vía intravenosa, como por ejemplo mediante inyección de una unidad de dosificación, por ejemplo.

Las composiciones terapéuticas de la presente revelación contienen un soporte tolerable fisiológicamente, junto con el relevante agente según se describe en la presente patente, disuelto o dispersado en el mismo como un ingrediente activo.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a composiciones, soportes, diluyentes y reactivos que representan materiales que son capaces de la administración a o en un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos no deseados tales como náusea, mareo, molestias gástricas y similares. La preparación de una composición farmacológica que contenga ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma, se entiende bien en el arte y no necesita estar limitada en base a la formulación. Habitualmente, tales composiciones están preparadas como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución, o suspensión, en líquido antes de su uso. La preparación puede también emulsionarse. El ingrediente activo puede ser mezclado con excipientes que sean farmacéuticamente aceptables para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente patente. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, suero fisiológico, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener menores cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes y emulsionantes, agentes tampón del pH y similares que aumentan la efectividad del ingrediente activo. La composición farmacéutica de la presente revelación puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes en la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácidas (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos hidroc্লórico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro, así como de bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares. Es particularmente

5 preferida la sal HCl cuando se usa en la preparación de polipéptidos cíclicos antagonistas de αv . Los soportes fisiológicamente tolerables son bien conocidos en el arte. Entre los ejemplos de soportes líquidos se encuentran soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua, o contienen un tampón tal como fosfato sódico a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina tamponada con fosfato. Aún más, los soportes acuosos pueden contener más de una sal tampón, además de sales tales como cloruros sódico y potásico, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con exclusión del agua. Ejemplos de estas fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales como aceite de semilla de algodón, y emulsiones de aceite en agua.

10 Habitualmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico en forma de, por ejemplo, un anticuerpo de bloqueo del receptor ErbB (ErbB1), un anticuerpo de bloqueo del receptor de integrina o un fragmento de anticuerpo o conjugado de anticuerpo, o un anticuerpo de bloqueo del receptor anti-VEGF, un fragmento o conjugado es una cantidad tal que, cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable, es suficiente para conseguir una concentración plasmática de aproximadamente 0,01 microgramos (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y, normalmente, aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Establecida de forma diferencial, la dosis puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones diarias durante uno o varios días. Cuando el agente inmunoterapéutico está en forma de fragmento de un anticuerpo monoclonal o un conjugado, la cantidad puede ajustarse fácilmente en base a la masa del fragmento / conjugado en relación con la masa del anticuerpo completo. Una concentración plasmática en molaridad preferida es de aproximadamente 2 micromolar (μM) a aproximadamente 5 milimolar (mM) y, preferiblemente, de aproximadamente 100 μM a 1 mM de antagonista del anticuerpo.

25 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente según esta invención que es un péptido no inmunoterapéutico o un polipéptido proteico u otra molécula biológica de tamaño similar, es habitualmente una cantidad de polipéptido tal que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para lograr una concentración plasmática de aproximadamente 0,1 microgramo (μg) por mililitro (ml) a aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, preferiblemente de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En base a un polipéptido que tiene una masa de aproximadamente 500 gramos por mol, la concentración plasmática preferida en molaridad es de aproximadamente 2 micromolar (μM) a aproximadamente 5 milimolar (mM) y preferiblemente de 100 μM a 1 mM de antagonista del polipéptido.

30 La dosis típica de un principio activo, que preferiblemente es un agente citotóxico o quimioterapéutico químico según la invención (ni un agente inmunoterapéutico ni un péptido/proteína no inmunoterapéutico) es de 10 mg a 1000 mg, preferiblemente, aproximadamente 20 a 200 mg y, más preferiblemente de 50 a 100 mg por kilogramo de peso corporal al día.

35 Las composiciones farmacéuticas de la revelación pueden comprender, abarca el tratamiento de un sujeto con agentes que reducen o evitan los efectos secundarios asociados con la terapia de combinación de la presente invención ("terapia adyuvante"), que incluye, pero no se limita a, aquellos agentes que, por ejemplo, reducen el efecto tóxico de agentes anticancerígenos, por ejemplo, inhibidores de la resorción ósea, agentes cardioprotectores. Dichos agentes adyuvantes previenen o reducen la incidencia de náuseas y vómitos asociados con quimioterapia, radioterapia o con la intervención quirúrgica, o reducen la incidencia de infecciones asociadas con la administración de fármacos anticancerígenos mielodepresores. Los agentes adyuvantes son bien conocidos en el arte. Los agentes inmunoterapéuticos según la revelación pueden administrarse adicionalmente con adyuvantes como BCG y estimuladores del sistema inmunitario. Adicionalmente, las composiciones pueden incluir agentes inmunoterapéuticos o agentes quimioterapéuticos que contienen radioisótopos citotóxicos efectivos u otros agentes citotóxicos, tales como péptidos citotóxicos (por ejemplo, citocinas) o fármacos citotóxicos y similares.

40 El término "*kit farmacéutico*" para el tratamiento de tumores o metástasis tumorales hace referencia a un envase y, como norma, a las instrucciones para el uso de los reactivos en métodos para tratar tumores y metástasis tumorales. Un reactivo en un kit de esta revelación se formula habitualmente como una composición terapéutica según se describe en este documento y, por tanto, puede estar en cualquiera de las diversas formas adecuadas para su distribución en un kit. Estas formas pueden incluir un líquido, polvo, comprimido, suspensión y la formulación similar para proporcionar las moléculas farmacéuticas de la presente revelación, preferiblemente anticuerpos anti-ErbB1. Los reactivos pueden proporcionarse en recipientes independientes adecuados para su administración por separado según los métodos actuales, o alternativamente pueden proporcionarse en combinación con una composición en un único recipiente en el envase. El envase puede contener una cantidad suficiente de una o más dosis de reactivos según los métodos de tratamiento descritos en este documento. Un kit de esta revelación también contiene las "instrucciones de uso" de los materiales contenidos en el envase.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 describe la unión de MAb 425 (EMD 72000) y c225 (Cetuximab) a diferentes células cancerígenas (A431, SK-OV3, HCT 116, MiaPaca-2, KYSE-30, KYSE-70), solo y en combinación, medido mediante citometría de flujo.

5 La Figura 2 representa la agregación de la célula diana efectora en dependencia de la concentración de anticuerpos (MAb 425, MAb 225, o una mezcla de ambos).

La Figura 3 muestra la inhibición de la unión de EGF a células tumorales A431 mediante MAb 425, MAb 225, o una mezcla de ambos.

La Figura 4 representa el desplazamiento de EGF enlazado en células cancerígenas A431 mediante MAb 425, MAb 225, o una mezcla de ambos.

10 La Figura 5 muestra la modulación por disminución del receptor de EGF en células A431 mediante una mezcla de MAb 425 humanizado (EMD 72000) y MAb 225 quimérico.

Ejemplos**Ejemplo 1:**

15 *Aumento de la unión del anticuerpo según una base por célula, combinando dos anticuerpos de bloqueo de EGFR (Cetuximab, EMD 72 000) con especificidades de epítipo diferentes.*

20 Seis líneas celulares tumorales humanas positivas en EGFR, que se originan a partir de carcinoma epidermoide de vulva (A431), adenocarcinoma del ovario (SK-OV-3), carcinoma de colon (HCT 116), carcinoma de páncreas (MiaPaca-2) y carcinoma de esófago (KYSE-30, KYSE-70) que expresan diferentes niveles de EGFR, se incubaron durante 15 minutos en hielo con 10 µg/ml de Cetuximab o EMD 72 000, respectivamente, o con una mezcla final que contiene 2,5 µg/ml de Cetuximab y 2,5 µg/ml de EMD 72 000 (concentración total de MAb: 5 µg/ml). A partir de ahí, las células se lavaron y se incubaron durante 15 minutos adicionales en hielo con 20 µg/ml de IgG+IgM(H+L)-F(ab')₂ de cabra anti-humano marcado con FITC como reactivo de 2ª etapa. Después de lavarlas, las células se analizaron mediante citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson) para sus intensidades de fluorescencia, que son aproximadamente equivalentes a la cantidad de anticuerpo enlazado por célula.

25 Como se muestra, independientemente de la concentración de tinción reducida utilizada para la mezcla de anticuerpos, las intensidades de fluorescencia de las células coloreadas con esta mezcla fueron en todos los casos mayores que las intensidades de fluorescencia de las células que se colorearon únicamente con uno de ambos anticuerpos a una concentración más elevada (Figura 1).

Ejemplo 2:

30 *Agregación de células dianas efectoras como pre-requisito para citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células y su mejora mediante la combinación de dos anticuerpos con especificidad para diferentes epítopos del EGFR humano (Cetuximab y EMD 72 000).*

35 En este modelo de experimento, se utilizaron células A431 positivas en EGFR como células diana. Se utilizaron células negativas en EGFR, células de linfoma histiocítico U937 positivas en receptor Fc-gamma (CD64 (FcγRI) y CD32 (FcγRII)) para mimetizar a las células efectoras. Las células A431 se marcaron con fluorescencia con verde PKH2 verde, las células U937 con rojo PKH26. Después de eso ambas líneas celulares se mezclaron con una relación de célula diana-efectora de 3:1, y se incubaron durante 15 minutos en hielo con diluciones en serie (concentraciones finales: 4,74 – 0,0015 µg/ml = 3,16x10⁻⁸ - 1x 10⁻¹¹ M, según se calculó con un MW de 150 kDa para ambos anticuerpos) de Cetuximab y EMD 72 000, respectivamente, o con una dilución en serie de una mezcla de
40 ambos anticuerpos que contiene la mitad de la concentración de inmunoglobulina total (2,37 – 0,00075 µg/ml = 1,58 x 10⁻⁸ - 5 x 10⁻¹² M; la concentración de cada uno de los MABs en esta mezcla fue 1/2 de esta concentración). Después de centrifugación durante 5 minutos a 50 x g y 4 °C, las células se incubaron durante 60 minutos más en hielo sin destruir los gránulos. Finalmente, los gránulos fueron cuidadosamente resuspendidos y las proporciones de agregados se determinaron mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FAC-Scan.

45 Tal como se muestra en la Figura 2, en comparación con los resultados de la incubación de células con solamente un único anticuerpo, el porcentaje máximo de agregados se ve aumentado en las muestras, que fueron incubadas con una mezcla de ambos MABs en una concentración de proteínas total inferior. La parte que aumenta de la curva de titulación para la mezcla de anticuerpo no se ve desplazada de manera significativa a pesar de la reducción de la concentración de proteína en estas muestras, en comparación con muestras incubadas únicamente con los MABs.

50

Ejemplo 3:

Aumento de la inhibición de la unión de EGF a células tumorales A431 mediante una mezcla de dos anticuerpos dirigidos en contra de diferentes epítomos del dominio de unión al ligando de EGFR.

Se pre-incubaron células A431 durante 15 minutos en hielo con 0,5 µg/ml de EMD 72 000, Cetuximab o una mezcla de ambos anticuerpos a la misma concentración. Después de retirarlas con lavado, las células de anticuerpo no enlazadas se incubaron durante otros 15 minutos en hielo con 0,01, 0,1, 1 o 10 µg/ml de EGF marcado con FITC de glándulas submaxilares de ratón (Molecular Probes Europe, Leiden, Países bajos), se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo.

Ambos anticuerpos inhibieron fuertemente la unión de EGF-FITC en todas las concentraciones. La mezcla de ambos anticuerpos, sin embargo, fue más efectiva que el anticuerpo solo en todos los casos (Figura 3).

10 **Ejemplo 4:**

Desplazamiento de EGF enlazado del EGFR de células A431.

Las células A431 se pre-incubaron durante 15 minutos en hielo con 10 µg/ml de EGF marcado con FITC de glándulas submaxilares de ratón (Molecular Probes Europe, Leiden, Países bajos). Después de esto, las células se lavaron y se incubaron durante 15 minutos con 10, 1 o 0,1 µg/ml de EMD 72 000 o Cetuximab, respectivamente, o con una mezcla de 2,5, 0,25 o 0,025 µg/ml de ambos anticuerpos (concentración de inmunoglobulina total: 5, 0,5 o 0,05 µg/ml). Las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo para EGF-FITC enlazado.

Ambos anticuerpos como agentes únicos de manera dependiente de la concentración, desplazaron el EGF del EGFR de células A431. La mezcla de ambos anticuerpos, que contenía un cuarto de las concentraciones de anticuerpos (1/2 de la inmunoglobulina total) de cada MAb, fue igualmente efectiva en el desplazamiento del ligando marcado con FITC que cada uno de ambos anticuerpos en una concentración mayor.

Ejemplo 5:

Modulación por disminución de EGFR mediante una mezcla de al menos dos anticuerpos contra diferentes epítomos del receptor, pero ninguna o sólo una reducción menor de los niveles de EGFR de la superficie celular mediante un único anticuerpo después de 24 horas de incubación de células A431 con MABs.

Se sembraron 2×10^6 células A431 en 2,5 ml de medio que contenía FCS al 10% (suero fetal bovino) en pocillos de microplacas de 6 pocillos. Los anticuerpos (Cetuximab, EMD 72 000) se añadieron a los cultivos en una concentración final de 10 µg/ml. Se utilizaron mezclas de ambos anticuerpos en concentraciones finales para cada anticuerpo de 10 µg/ml (mezcla 1) o 5 µg/ml (mezcla 2), lo que dio como resultado una concentración total de anticuerpos de 20 y 10 µg/ml respectivamente. Las células se incubaron a continuación en presencia de los anticuerpos durante 24 horas a 37 °C y 10% de CO₂. Después de eso, las células se recolectaron mediante tratamiento con Tripsina/EDTA (0,05/0,02 %), se lavaron y se incubaron durante 15 minutos en hielo con 20 µg/ml de IgG+IgM(H+L)-F(ab')₂ de cabra anti-humano marcado con FITC como reactivo de 2ª etapa para la detección de anticuerpos anti-EGFR enlazados a superficie o 10 µg/ml de MAb425 marcado con FITC (predecesor murino de EMD 72 000) para la detección de sitios de unión no ocupados para EMD 72 000. Finalmente, las células se analizaron mediante citometría de flujo. La Figura 5 demuestra que el EMD 72 000 y su predecesor murino MAb425 compiten por la unión a sus epítomos en EGFR y que el EMD 72 000 enlazado casi completamente puede inhibir la unión de MAb425-FITC. En contraste con esto, el Cetuximab pre-enlazado sólo inhibe mínimamente la unión de MAb425-FITC en comparación con células de control sin tratar. Esto indica claramente que ambos anticuerpos se unen a distintos epítomos de EGFR. Además, esta figura muestra que después de la incubación de las células durante 24 horas en presencia de ambas concentraciones de la mezcla de anticuerpos la intensidad de fluorescencia del reactivo de 2ª etapa marcado con FITC utilizado para la detección de anticuerpos enlazados a la superficie se ve claramente reducida.

Esto indica que los niveles de EGFR de superficie de las células tratadas con la mezcla de anticuerpos se reducen claramente en comparación con células que se cultivaron con tan solo uno de los anticuerpos. Por tanto, los complejos anticuerpo-receptor más grandes formados por la mezcla de MABs parecen ser internalizados y/o procesados por otros mecanismos que los complejos pequeños de anticuerpo-receptor que consisten en únicamente dos receptores después del entrecruzamiento por una molécula de anticuerpo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende (a) una primera molécula de anticuerpo, que comprende sitios de unión que se unen a un primer epítipo específico presente en una molécula del receptor ErbB1, y (b) una segunda molécula de anticuerpo que comprende sitios de unión que se unen a un segundo epítipo específico diferente en el mismo tipo de molécula del receptor ErbB1 en donde
- (i) dicho primer y dicho segundo epítipo en el receptor ErbB1 está situado dentro del dominio de unión del receptor ErbB1,
- (ii) al menos una de dichas moléculas de anticuerpos se une a un epítipo dentro del dominio de unión del receptor ErbB1 al que el ligando natural del receptor ErbB1 se une, y
- 10 (iii) dicho primer anticuerpo es MAb 425 humanizado (h425) y dicho segundo anticuerpo es MAb 225 quimérico (c225).
2. Composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un agente citotóxico.
3. Composición farmacéutica de la reivindicación 2, en donde dicho agente citotóxico es un agente quimioterapéutico.
- 15 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona de cualquiera de los compuestos del grupo: cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, bleomicina.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en donde dicho agente citotóxico es un inhibidor del receptor ErbB, un inhibidor del receptor de VEGF, un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de proteína quinasa A, un agente anti-angiogénico, o una citocina.
- 20 6. Kit farmacéutico que comprende (i) un primer paquete que comprende una primera molécula de anticuerpo, o una parte de la misma, que comprende sitios de unión que se unen a un primer epítipo específico presente en una molécula del receptor ErbB1, y (ii) un segundo paquete que comprende una segunda molécula de anticuerpo que comprende sitios de unión que se unen a un segundo epítipo específico diferente en el mismo tipo de molécula del receptor ErbB1, en donde
- 25 (a) dicho primer y segundo epítipo en el receptor ErbB1 está situado dentro del dominio de unión del receptor ErbB1,
- (b) al menos una de dichas moléculas de anticuerpo se une a un epítipo dentro del dominio de unión del receptor ErbB1 al que el ligando natural del receptor se une, y
- 30 (c) el primer paquete comprende MAb 425 humanizado (h425) y el segundo paquete comprende MAb 225 quimérico (c225).
7. Kit farmacéutico de la reivindicación 6 que comprende un tercer paquete que comprende un agente citotóxico.
8. Kit farmacéutico de la reivindicación 7, en donde dicho agente citotóxico es un agente quimioterapéutico.
9. Kit farmacéutico de la reivindicación 8, en donde dicho agente quimioterapéutico se selecciona de cualquiera de los compuestos del grupo: cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, docetaxel, paclitaxel, bleomicina.
- 35 10. Kit farmacéutico de la reivindicación 7, en donde dicho fármaco citotóxico es un inhibidor del receptor ErbB, un inhibidor del receptor de VEGF, un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de la proteína quinasa A, un agente anti-angiogénico, o una citocina.
11. Composición farmacéutica o kit farmacéutico según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10 para su uso para el tratamiento de tumores sólidos y metástasis tumorales que expresan el receptor ErbB1.
- 40 12. Composición farmacéutica o kit farmacéutico según la reivindicación 11, en donde el tumor es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, SCLC, o cáncer de páncreas.

Fig. 1

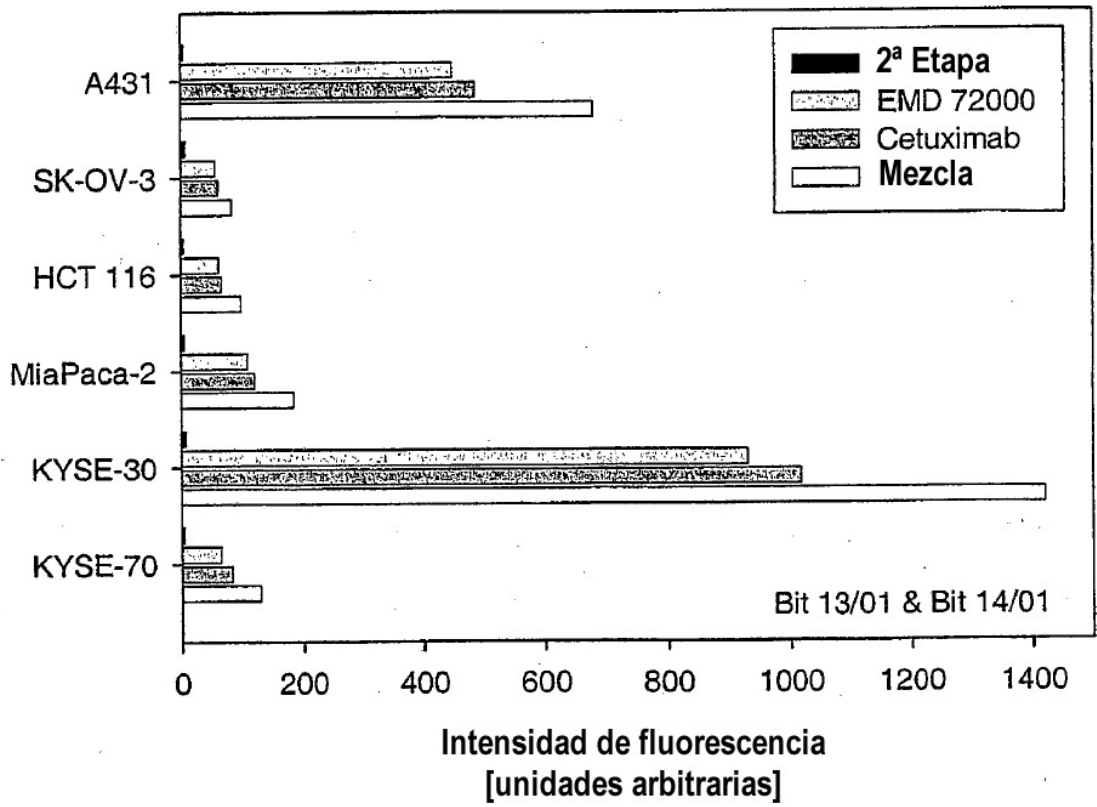


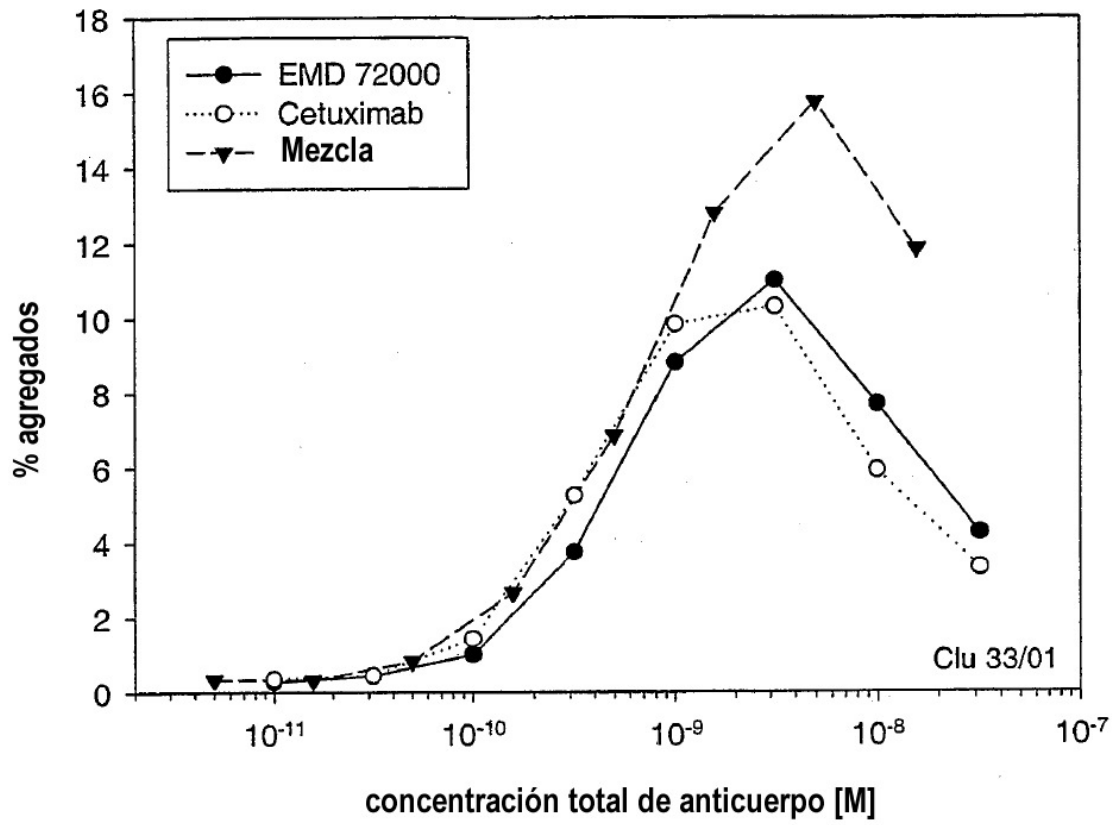
Fig. 2

Fig. 3

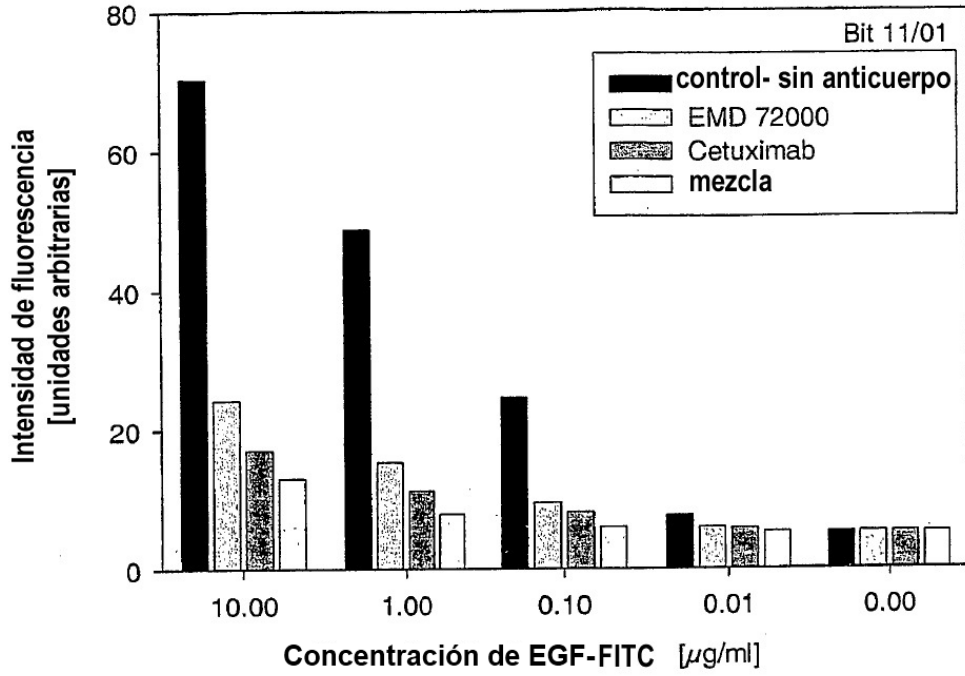


Fig. 4

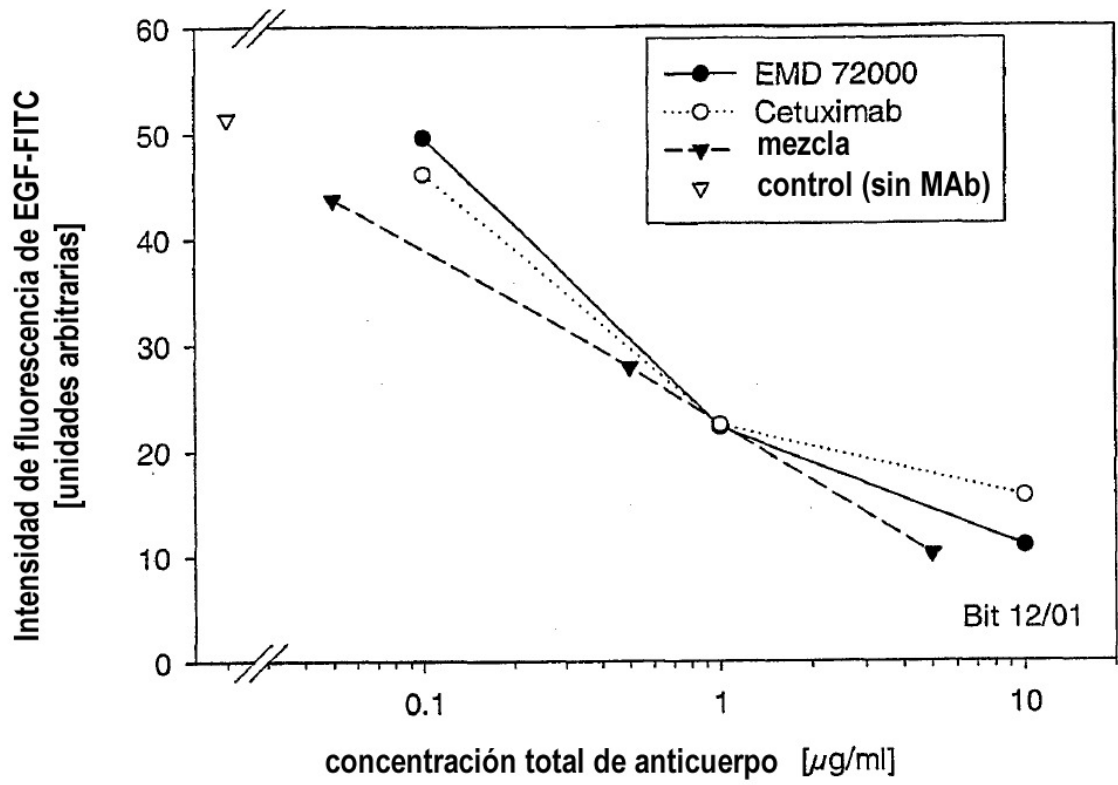


Fig. 5

