

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 609 094**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 31/7072** (2006.01)  
**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61K 31/498** (2006.01)  
**A61K 31/19** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61K 31/47** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.01.2008 PCT/US2008/001024**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2008 WO08091701**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2008 E 08724838 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2126127**

---

(54) Título: **Uso de anticuerpos anti-EGFR en el tratamiento de enfermedades mediadas por un EGFR mutante**

(30) Prioridad:

**25.01.2007 US 897383 P**

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

**18.04.2017**

(73) Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.**  
**(100.0%)**  
**450 Brookline Avenue**  
**Boston, MA 02215, US**

(72) Inventor/es:

**WONG, KWOK-KIN y**  
**SCOTT, ANDREW, MARK**

(74) Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**ES 2 609 094 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

Uso de anticuerpos anti-EGFR en el tratamiento de enfermedades mediadas por un EGFR mutante.

## 5 Campo de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere a un anticuerpo MAB 806 anti-EGFR para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por el EGFR, más particularmente del cáncer, que es resistente a las terapias con un inhibidor de la cinasa de tirosina.

10

## Antecedentes de la invención

**[0002]** La terapia oncológica dirigida está diseñada para disrupir la función de las moléculas específicas necesarias para la carcinogénesis y el crecimiento del tumor, y por lo tanto destruye o previene el crecimiento de las 15 células cancerosas (Ji H et al (2006) Cell Cycle 5 (18): 2072-2076 publicación electrónica del 15 de septiembre de 2006). Al contrario que la quimioterapia citotóxica convencional, dichas terapias oncológicas dirigidas pueden ser más eficaces y menos perjudiciales para las células normales. Un importante esfuerzo en el campo de la terapia oncológica dirigida ha sido el desarrollo de agentes que se dirigen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR es un miembro de la familia ErbB de receptores estrechamente relacionados, que incluyen el 20 EGFR (ErbB-1), el Her2/neu (ErbB-2), el Her3 (ErbB-3) y el Her4 (ErbB-4). La activación del EGFR da lugar a la activación de la cinasa de tirosina del receptor y a una serie de acontecimientos de señalización cascada abajo que median en la proliferación, la motilidad, la adhesión, la invasión y la resistencia celular a la quimioterapia, así como en la inhibición de la apoptosis (2-4), procesos que son cruciales para la continua proliferación y supervivencia de las células cancerosas.

25

**[0003]** Hasta la fecha, en el ámbito clínico han entrado dos principales tipos de agentes anti-EGFR: los anticuerpos anti-EGFR y los inhibidores de la cinasa de tirosina (TKI) del EGFR de molécula pequeña (5, 6). Los anticuerpos anti-EGFR, tales como el cetuximab, se diseñaron para unirse al dominio extracelular del EGFR y bloquear la activación de la señalización cascada abajo del EGFR (7). El cetuximab (también conocido como el 30 anticuerpo 225, Patente de EE.UU. 4.943.533) se creó contra las células A431, que expresan elevados niveles del EGFR natural. Por el contrario, los TKI de molécula pequeña tales como el gefitinib (compuesto ZD1839, Iressa) o el erlotinib (compuesto OSI-774, Tarceva) compiten con el ATP por la unión al dominio catalítico intracelular de la cinasa de tirosina del EGFR, por lo tanto, previenen la autofosforilación del EGFR y la señalización cascada abajo (4).

35

**[0004]** Estos dos grupos de fármacos anti-EGFR han mostrado una cierta eficacia clínica en un subconjunto de pacientes con una diversidad de diferentes tipos de cáncer. El tratamiento con gefitinib o con erlotinib en pacientes con cáncer de pulmón que tienen mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR a menudo generan unas respuestas clínicas drásticas (5, 8). Sin embargo, la eficacia del gefitinib o del erlotinib en el adenocarcinoma 40 de pulmón con un EGFR natural, o en otro subtipo histológico, tal como el carcinoma epidermoide, es limitada (9, 10). Adicionalmente, en ensayos preclínicos y clínicos se ha demostrado que el gefitinib o el erlotinib son muy ineficaces en la inhibición de la función del EGFRvIII mutante (11), una mutación característica activadora del EGFR en la que hay una delección en marco de los exones II hasta VII (indicada también como EGFR de2-7). El EGFRvIII se encuentra habitualmente en los glioblastomas, y recientemente se ha averiguado que está presente en un 45 subconjunto de carcinomas epidermoides de pulmón humanos (12) y en una gran parte de los cánceres de cabeza y cuello (13).

**[0005]** Se ha demostrado que el cetuximab es eficaz en un pequeño subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), y en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, así como en pacientes con cáncer 50 colorrectal. Sin embargo, la respuesta al cetuximab no parece estar correlacionada con los niveles de expresión del EGFR. Por lo tanto, no está claro por qué estos pacientes responden mientras que otros pacientes oncológicos cuyos tumores tienen una elevada expresión del EGFR son resistentes al tratamiento con cetuximab (14). Perez-Torres et al. (J. Biol Chem (2006) 281 (52): 40183-40192) informan sobre los efectos los mecanismos de acción del anticuerpo cetuximab en células cancerosas de pulmón que expresan de forma natural mutaciones en el 55 receptor, y en células hematopoyéticas 32D ErbB-null transfectadas con un EGFR mutante.

**[0006]** Dado que la expresión del receptor EGFR vIII mutante está restringida a las células tumorales, representa un objetivo muy específico para la terapia con anticuerpos. Consecuentemente, se han generado anticuerpos tanto policlonales como monoclonales específicos para el péptido único del EGFR de2-7. Una serie de

MAb de ratón, aislados después de una inmunización con el péptido único de2-7, mostraron, todos, selectividad y especificidad para el receptor truncado, y se dirigieron a los xenoinjertos positivos del EGFR de2-7 cultivados en ratones lampiños (Wikström CJ et al (1995) *Cancer Res* 55: 3140-3148; Okamoto, S et al (1996) *Br J Cancer* 73: 1366-1372; Hills D et al (1995) *Int J Cancer* 63: 537-543; Reist CJ et al (1997) *Cancer Res* 57: 1510-1515; Reist CJ et al (1995) *Cancer Res* 55: 4375-4382; Patente de EE.UU. 5.401.828). Algunos ejemplos de anticuerpos anti-EGFR vIII incluyen ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A.4 e Y10.

**[0007]** El MAb 806 es un nuevo anticuerpo murino, creado originalmente para reconocer el mutante de truncamiento único, el EGFRvIII, mediante el uso de células completas que expresan el EGFR vIII mutante como inmunógeno (15-17). De forma importante, el epítopo reconocido por el MAb 806 no es accesible en los EGFR naturales inactivos (wt), pero está expuesto en la forma transicional del EGFR wt en las células con una sobreexpresión del EGFR, y con una expresión del EGFRvIII (18). Los estudios de epítopos están apoyados por estudios inmunohistoquímicos que demuestran que el anticuerpo 806 se une a los epítopos presentes en los gliomas, así como a un amplio abanico de cánceres epiteliales, pero no a los tejidos humanos normales (16, 19). Estos y otros datos preclínicos sugieren que el MAb 806 podría tener un espectro diferente de actividad clínica y un perfil de efectos secundarios distintos a los del cetuximab y a los de otros anticuerpos anti-EGFR. En modelos de xenoinjerto, el MAb 806 ha mostrado una potente actividad antitumoral sin ningún direccionamiento hacia los tejidos normales. Por lo tanto, las capacidades de direccionamiento únicas del MAb 806 representan un nuevo paradigma en la terapia molecular dirigida específica para el cáncer.

20 Mishima et al. (*Cancer Res* (2001) 61 (14): 5349-5354) notifican que, *in vivo*, el tratamiento con el MAb 806 dio como resultado una reducción en la fosforilación del DeltaEGFR constitutivamente activo y provocó una expresión regulada por disminución del protector apoptótico, el Bcl-XL.

**[0008]** Cuando están sobreexpresadas o son activadas por mutaciones, las cinasas de tirosina, incluyendo el EGFR, contribuyen al desarrollo del cáncer, y estas y otras enzimas cinasas de tirosina (TK) mutadas a menudo proporcionan un objetivo o una sensibilidad para la terapia oncológica selectiva y específica. Las mutaciones somáticas en los dominios de la cinasa de tirosina del gen del EGFR están asociadas con una sensibilidad hacia los cánceres de pulmón de ciertos inhibidores de la cinasa de tirosina (TKI), incluyendo el gefitinib y el erlotinib. Se han identificado delecciones en marco del EGFR en el exón 19 (del L747-S752), y frecuentes mutaciones puntuales en el codón 858 (exón 21) (L858R) en cánceres de pulmón no microcíticos y en adenocarcinomas, y se han asociado con una sensibilidad hacia los TKI gefitinib y erlotinib (Lynch TJ et al (2004) *N Engl J Med* 350: 2129-2139; Paez JG et al (2004) *Science* 304: 1497-1500; Pao W et al (2004) *PNAS* 101 (36): 13306-13311). Algunos estudios recientes han demostrado que un 10-30 % de los pacientes con NSCLC tienen mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR, mientras que un 5 % de los pacientes con carcinoma de pulmón epidermoide (SCC) tienen la mutación del dominio extracelular EGFRvIII (12, 20). Los procedimientos para la determinación de la sensibilidad del cáncer frente a los tratamientos dirigidos al EGFR, basados en la evaluación de las mutaciones en el EGFR, particularmente en el dominio de la cinasa, y la sensibilidad predicha al inhibidor en los pacientes, se describen en Bell et al (documento WO 2005/094357 y documento US20060147959).

40 **[0009]** La resistencia adquirida a la quimioterapia o a la terapia oncológica dirigida, mediada por una resistencia secundaria o por mutaciones compensadoras, es un reto continuo. Los tumores que son sensibles a los TKI, incluyendo tanto al gefitinib como al erlotinib, finalmente progresan a pesar del tratamiento continuado con los TKI. Se ha identificado una mutación secundaria en la posición 790 del EGFR (T790M) en biopsias de tumores de pacientes con recaídas y resistentes (Kobayashi S et al (2005) *N Engl J Med* 352 (8): 786-792). Se ha predicho que esta mutación da lugar a un impedimento estérico en la unión del inhibidor en el bolsillo de unión de la ATP-cinasa.

**[0010]** En vista de la existencia y de la prevalencia de una resistencia adquirida a los TKI en la enfermedad mediada por el EGFR, y de la significativa tasa de recaídas del cáncer, existe una necesidad clínica de protocolos de tratamiento más ampliamente eficaces, que empleen agentes dirigidos al EGFR que sean eficaces frente a, se dirijan o eviten, una resistencia adquirida en los mutantes del EGFR y en la enfermedad mediada por el EGFR.

**[0011]** La mención de las referencias del presente documento no debe ser interpretada como una admisión de que éstas son una técnica anterior a la presente invención.

55 Resumen de la invención

**[0012]** Ahora se han identificado mutaciones activadoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en diversos cánceres mediados por el EGFR, incluyendo el cáncer de pulmón. Se han identificado mutaciones del EGFR en el cáncer de pulmón no microcítico humano (NSCLC), teniendo un 5 % de los carcinomas

de pulmón epidermoides mutaciones en el *EGFRvIII*, y teniendo un 10 ~ 30 % de los adenocarcinomas de pulmón mutaciones en el dominio de la cinasa del *EGFR*. El anticuerpo monoclonal dirigido al *EGFR*, el MAb 806, reconoce un epítopo conformacional del *EGFR* natural (wt), así como el mutante truncado, el *EGFRvIII*. En un esfuerzo por caracterizar adicionalmente la aplicación del MAb 806 a la terapia oncológica mediada por el *EGFR*, se usó el MAb 806 para el tratamiento de ratones modificados genéticamente con tumores de pulmón que estaban dirigidos por mutaciones en el *EGFRvIII* o en los dominios de la cinasa del *EGFR*. La presente descripción confirma que el anticuerpo anti-*EGFR* vIII, particularmente el MAb 806, es notablemente eficaz en el bloqueo de la señalización del *EGFRvIII* y en la inducción de apoptosis en las células tumorales, dando como resultado una regresión tumoral drástica en los cánceres de pulmón murinos dirigidos por el *EGFRvIII*. Un anticuerpo característico dirigido al *EGFR*, 10 creado contra las células que expresan unos elevados niveles del *EGFR* natural, el cetuximab, no consiguió mostrar actividad en estos tumores de pulmón definidos genéticamente. Además, el tratamiento de tumores de pulmón murinos dirigidos por una mutación en el dominio de la cinasa del *EGFR* reconocida y clínicamente relevante (L858R) con el MAb 806 indujo una regresión significativa del tumor. Se ha demostrado que esta mutación en el dominio de la cinasa es sensible a la terapia con los TKI, particularmente con gefitinib o con erlotinib.

15

**[0013]** La resistencia adquirida a los TKI, incluyendo tanto a gefitinib como a erlotinib, es un reto continuo, y los tumores que son sensibles a los TKI finalmente progresan, a pesar de una terapia continuada. Esta resistencia adquirida puede estar mediada por una resistencia secundaria o por mutaciones compensadoras, que incluyen particularmente una mutación secundaria en la posición 790 del *EGFR* (T790M). Los investigadores demuestran 20 ahora que el anticuerpo anti-*EGFR*, particularmente el MAb 806, es eficaz frente a la mutación T790M, dando como resultado una regresión drástica del tumor en los cánceres de pulmón murinos dirigidos por la T790M/L858R del *EGFR*. Tomados conjuntamente, estos datos demuestran que el anticuerpo anti-*EGFR*, particularmente el MAb 806, proporciona una alternativa o un adjunto en el tratamiento de los pacientes con mutaciones en el dominio de la cinasa del *EGFR*, incluyendo pacientes oncológicos, particularmente en los pacientes con cáncer de pulmón.

25

**[0014]** La descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad mediada por el *EGFR* resistente a un inhibidor de la cinasa de tirosina en un mamífero, en el que dicha enfermedad resistente mediada por el *EGFR* es el resultado de una mutación secundaria en el *EGFR* para generar un *EGFR* mutante, y en el que dicha mutación es distinta de la mutación *EGFR* vIII, que comprende la administración a dicho mamífero de 30 una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-*EGFR* capaz de unirse y de inhibir el *EGFR* mutante. En un caso particular, la mutación secundaria del *EGFR* es una mutación en el dominio de la cinasa de tirosina del *EGFR*. En un paso adicional, la mutación en el dominio de la cinasa de tirosina es la T790M.

**[0015]** En un caso particular del procedimiento, el anticuerpo anti-*EGFR* es el anticuerpo MAb 806 o un 35 fragmento activo del mismo. El MAb 806 incluye un anticuerpo murino, un anticuerpo recombinante o un anticuerpo humanizado.

**[0016]** Algunos anticuerpos anti-*EGFR* adicionales, incluyendo aquellos dirigidos al *EGFRvIII* mutante, pueden ser utilizados en los procedimientos terapéuticos de la descripción. Algunos ejemplos de anticuerpos 40 conocidos anti-*EGFR* pueden seleccionarse entre ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A4 y o fragmentos activos de los mismos.

**[0017]** La enfermedad mediada por el *EGFR* para su tratamiento con los procedimientos incluye el cáncer. Algunos cánceres mediados por el *EGFR* incluyen glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, 45 cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. En un caso particular, el cáncer mediado por el *EGFR* es un adenocarcinoma de pulmón, un carcinoma epidermoide o un cáncer de pulmón no microcítico.

**[0018]** La descripción proporciona un procedimiento para la reducción del crecimiento tumoral mediado por el *EGFR* en un paciente con cáncer, en el que dicho paciente con cáncer ha sido tratado previamente con uno o más inhibidores de la cinasa de tirosina y ha desarrollado una enfermedad y un crecimiento tumoral recurrente, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-*EGFR*, de forma que la enfermedad y el crecimiento tumoral recurrente se inhiban y se reduzcan.

55

**[0019]** En un caso particular del procedimiento para la reducción del crecimiento tumoral, el anticuerpo anti-*EGFR* es el anticuerpo MAb 806 o un fragmento activo del mismo. El MAb 806 incluye un anticuerpo murino, un anticuerpo recombinante o un anticuerpo humanizado.

**[0020]** Pueden utilizarse algunos anticuerpos anti-EGFR adicionales, incluyendo aquellos dirigidos al EGFRvIII mutante. Algunos ejemplos de anticuerpos conocidos anti-EGFR pueden seleccionarse entre ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A4 y o fragmentos activos de los mismos.

5 **[0021]** En un caso clínico en particular, la enfermedad y el crecimiento tumoral recurrente en el paciente oncológico es el resultado de una mutación secundaria en el EGFR que es una mutación en el dominio de la cinasa de tirosina del EGFR. Una mutación secundaria en particular del EGFR es la mutación en el dominio de la cinasa de tirosina T790M.

10 **[0022]** La descripción también proporciona un procedimiento para el tratamiento de un cáncer mediado por el EGFR en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de un inhibidor de la cinasa de tirosina y de un anticuerpo anti-EGFR, en el que dicho anticuerpo anti-EGFR es administrado después del tratamiento con el inhibidor de la cinasa de tirosina como terapia de segunda línea para inhibir los potenciales EGFR mutantes y resistentes a los inhibidores de la cinasa de tirosina.

15 **[0023]** El cáncer mediado por el EGFR puede seleccionarse entre glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. En particular, el cáncer es un adenocarcinoma de pulmón, un carcinoma 20 epidermoide o un cáncer de pulmón no microcítico.

**[0024]** En un caso de este procedimiento, el inhibidor de la cinasa de tirosina es un inhibidor reversible de la cinasa de tirosina. El inhibidor reversible de la cinasa de tirosina puede ser una aniliniquinazolina y se selecciona entre gefitinib, erlotinib, AG1478, ST1571 y SU-6668.

25 **[0025]** En un caso adicional de este procedimiento, el inhibidor de la cinasa de tirosina es un inhibidor irreversible de la cinasa de tirosina. Algunos ejemplos de inhibidores irreversibles de la cinasa de tirosina son conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a EKB-569, EKI-569, HKI-272, HKI-357 y BIBW 2992.

Tomando como base la presente descripción, la presente invención proporciona un anticuerpo MAb 806 anti-EGFR 30 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de un cáncer mediado por el EGFR resistente a un inhibidor de la cinasa de tirosina en un mamífero, en el que dicho cáncer resistente mediado por el EGFR comprende una mutación secundaria T790M en el EGFR.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un anticuerpo MAb 806 anti-EGFR o un fragmento de unión al antígeno del mismo para uso en el tratamiento de un cáncer mediado por el EGFR resistente a un inhibidor 35 de la cinasa de tirosina en un mamífero, en el que dicho anticuerpo o fragmento va a ser administrado después del tratamiento con un inhibidor de la cinasa de tirosina.

La presente invención y las realizaciones de la misma se establecen en las reivindicaciones anexas.

**[0026]** Otros objetos y ventajas serán evidentes para los expertos en la materia a partir de una revisión de la 40 siguiente descripción que sigue, con referencia a los siguientes dibujos ilustrativos.

Breve descripción de los dibujos

**[0027]**

45 La **FIGURA 1** representa tumores de pulmón murinos dirigidos por la expresión del EGFRvIII que son sensibles al tratamiento con el anticuerpo MAb 806 y el ch806, pero resistentes al tratamiento con cetuximab. Se trataron ratones *Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-* con el MAb 806 o bien con el ch806 a 0,5 mg por dosis, o con cetuximab a 1 mg por dosis a través de una inyección I.P. diaria. Los anticuerpos se administraron cada dos días a la misma dosis después de la primera semana de tratamiento. Se muestran las imágenes sucesivas de RMN tomadas en los puntos temporales indicados, que se corresponden con las secciones de los ratones representativos en cada grupo de tratamiento. El diagrama de barras está expresado como la media ± desviación típica (DT) que ilustra la regresión del tumor medida mediante las imágenes de RMN, y los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de la prueba de la *t* de Student exacta. Todos los ratones se mantuvieron bajo una dieta de doxiciclina a lo largo del 55 experimento. H: indica el área del corazón.

Las **FIGURAS 2A y 2B** representan las características histopatológicas de adenocarcinomas de pulmón en ratones dirigidos por el EGFRvIII tratados con el MAb 806. (A) Adenocarcinoma de pulmón dirigido por la expresión del EGFRvIII durante más de 8 semanas (panel superior). Después de 1 semana el tratamiento con el MAb 806, los tumores se redujeron y tenían un aumento en la fibrosis (panel intermedio). Las muestras de pulmón eran

macroscópicamente normales cuando finalizó el tratamiento con el MAb 806 a las 5 semanas (panel inferior). Las flechas muestran un nódulo fibrótico, que consiste en fibroblastos y macrófagos. No se encontraron células tumorales en esta área de fibrosis en particular. Panel izquierdo: 100X, panel derecho: 800X. (B) Pueden observarse unos patrones y unas intensidades en la tinción inmunohistoquímica similares en el total de los EGFR de los ratones 5 de control y en los de los ratones tratados con el MAb 806 durante 1 semana (panel superior e inferior izquierdo, respectivamente); la intensidad de la tinción del fosfo-EGFR de las células tumorales disminuyó después de 1 semana de tratamiento (panel inferior derecho) cuando se comparan con los tumores sin tratar (panel superior derecho). Se toman fotos representativas con un aumento de 200X. (C) La tinción TUNEL muestra un aumento de núcleos apoptóticos (flechas rojas) en los tumores de pulmón dirigidos por el EGFRvIII después de 1 semana de 10 tratamiento con el MAb 806 (panel inferior izquierdo) cuando se comparan con los tumores sin tratar (panel superior izquierdo). Se toman fotos representativas con un aumento de 200X. Los diagramas de barras, expresados como la media  $\pm$  DT, ilustran los índices de apoptosis en los tumores pulmonares, que se determinaron antes y después de 1 semana de tratamiento con el MAb 806 a partir de al menos 200 campos de gran aumento (HPF). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de prueba de la *t* de Student exacta (panel derecho).

15 La **FIGURA 3** muestra el análisis mediante una inmunotransferencia Western de un lisado de pulmón completo procedente de ratones *Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-/-* tratados con el MAb 806. Se analizaron los lisados completos de pulmón procedentes de tumores obtenidos a partir de ratones en diferentes puntos temporales del tratamiento con el MAb 806. La inhibición de la fosforilación del EGFR puede observarse tan pronto como después de 1 semana de tratamiento, mientras que el nivel de los EGFR totales disminuye únicamente después de 5 20 semanas de tratamiento. La fosforilación de Erk1,2 fue inhibida por el anticuerpo a lo largo de la administración de MAb 806, pero la fosforilación de la AKT permanecía en un nivel comparable al de los controles sin tratar en ambos puntos temporales del tratamiento. La actina  $\beta$  sirve como control de carga.

**FIGURAS 4A y 4B.** El adenocarcinoma de pulmón de ratón dirigido por la mutación L858R en el dominio de la cinasa del EGFR responde al tratamiento con el ch806. (A) Se trataron ratones *Tet-op-EGFR L858R-IRES-Luciferase/CCSP-rtTA* con el ch806 a 0,5 mg por dosis mediante una inyección I.P. diaria durante 4 semanas. Las imágenes de la RMN mostraban una disminución en el volumen del tumor después de 2 y de 4 semanas de tratamiento. El diagrama de barras, expresado como la media  $\pm$  DT, ilustra la regresión del tumor medida mediante las imágenes de RMN, y los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de prueba de la *t* de Student exacta. H: indica el área del corazón. (B) El análisis histopatológico muestra un encogimiento de los tumores y una 25 notable infiltración de macrófagos en los ratones *Tet-op-EGFR L858R-IRES-Luciferase/CCSP-rtTA* (los dos paneles derechos), cuando se comparan con los controles sin tratamiento (los dos paneles izquierdos). Las fechas muestran los focos de los tumores y los residuales. Se muestran fotos de ambos aumentos a 100X y a 800X, según se indica mediante las notas al pie de la figura.

30 Las **FIGURAS 5A y 5B** representan los resultados del tratamiento de los tumores de pulmón del EGFR T790M-L858R con el MAb 806 frente a cetuximab. Se obtuvieron imágenes por RMN de los ratones con una dieta continua de doxiciclina durante más de 8 semanas, para documentar la carga tumoral. El MAb 806 fue administrado a los ratones portadores de tumores de pulmón a través de una inyección I.P. diaria a una dosis de 0,5 mg durante 4 semanas. El cetuximab se administra a los ratones mediante una inyección I.P. a 1 mg por dosis diariamente durante 40 4 semanas. Se usaron los compañeros de camada como controles para todos los estudios del tratamiento (sin tratamiento). (A) Se obtuvieron imágenes de los ratones mediante una RMN a las 0, 2, y 4 o 5 semanas para determinar la reducción en el volumen tumoral. (B) Despues de finalizar el tratamiento y la obtención de las imágenes de RMN, los ratones fueron sacrificados para estudios histológicos y bioquímicos adicionales.

#### Descripción detallada

45 **[0028]** De acuerdo con la presente descripción, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, de microbiología y de ADN recombinante en la pericia de la técnica. Dichas técnicas están explicadas completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volúmenes I-TII [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

50 **[0029]** Por lo tanto, si aparecen en el presente documento, los siguientes términos deben tener las definiciones establecidas a continuación.

**[0030]** El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina tanto natural como producida sintéticamente

parcial o totalmente. Un anticuerpo incluye cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se une a un epítopo específico. El término engloba anticuerpos policionales, monoclonales, recombinantes, humanizados y quiméricos. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que tiene un dominio de unión que es, o es homólogo de, un dominio de unión a un anticuerpo. En este término también se 5 contemplan anticuerpos injertados con CDR.

**[0031]** Como los anticuerpos pueden ser modificados de diversas formas, debe interpretarse que el término "anticuerpo" cubre cualquier miembro o sustancia de unión específica que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. Por lo tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes y 10 homólogos funcionales de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a una inmunoglobulina, tanto natural como total o parcialmente sintético. Por lo tanto, también están incluidas las moléculas químéricas que comprenden un dominio de unión a una inmunoglobulina, o un equivalente, fusionado con otro polipéptido. La clonación y la expresión de anticuerpos químéricos se describen en el documento EP-A-0120694 y en el documento EP-A-0125023, y en las Patentes de EE.UU. nº 4.816.397 y 4.816.567.

**[0032]** Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden llevar a cabo la función de los antígenos de unión. Algunos ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo individual; (iv) el fragmento dAb (Ward, E. S. et al., *Nature* 20 341,544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas de Fv de cadena individual (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un péptido conector que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al, *Science*, 242, 423-426, 1988; Huston et al, *PNAS* EE.UU., 85, 5879-5883, 1988); (viii) fragmentos de anticuerpos multivalentes (dímeros, trímeros y/o tetrámeros de 25 scFv (Power y Hudson, *J Immunol. Methods* 242: 193-204 9 (2000)) (ix) dímeros biespecíficos de Fv de cadena individual (documento PCT/US92/09965) y (x) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante una fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger et al *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90 6444-6448, (1993)).

**[0033]** Un "sitio de combinación de un anticuerpo" es aquella porción estructural de una molécula de un anticuerpo formada por regiones variables e hipervariables de la cadena ligera o de la cadena pesada y ligera que se unen específicamente al antígeno.

**[0034]** La expresión "molécula de anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales según se usan en el 35 presente documento contempla en tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

**[0035]** Algunos ejemplos de moléculas de anticuerpo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que 40 contienen el parátopo, incluyendo aquellas porciones conocidas en la materia como Fab, Fab', F(ab')2 y F(v), porciones que son preferidas para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento.

**[0036]** Los anticuerpos también pueden ser biespecíficos, en los que un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específico de la descripción, y el otro dominio de unión tiene una especificidad diferente, por 45 ejemplo, para reclutar una función efectora, o similares. Los anticuerpos biespecíficos de la presente descripción incluyen aquellos en los que un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específico de la presente descripción, incluyendo un fragmento del mismo, y el otro dominio de unión es un anticuerpo distinto o un fragmento del mismo, incluyendo el de un anticuerpo anti-EGFR distinto, por ejemplo, el anticuerpo 528 (Patente de EE.UU. Nº 4.943.533), el anticuerpo 225 químérico y humanizado (Patente de EE.UU. Nº 4.943.533 y documento 50 WO/9640210), un anticuerpo anti-de2-7 tal como el DH8.3 (Hills, D. et al (1995) *Int. J. Cancer* 63 (4): 537-543), un anticuerpo L8A4 e Y10 (Reist, CJ et al (1995) *Cancer Res.* 55 (19): 4375-4382; Foulon CF et al. (2000) *Cancer Res.* 60 (16): 4453-4460), el ICR62 (Modjtahedi H et al (1993) *Cell Biophys.* Ene-Jun; 22 (1-3): 129-46; Modjtahedi et al (2002) *P.A.A.C.R.* 55 (14): 3140-3148, o el anticuerpo de Wikstrand et al (Wikstry C. et al (1995) *Cancer Res.* 55 (14): 3140-3148). El otro dominio de unión puede ser un anticuerpo que reconoce o se dirige a un tipo celular en 55 particular, como un anticuerpo específico para células neurales o gliales. En los anticuerpos biespecíficos de la presente descripción, uno de los dominios de unión del anticuerpo de la descripción puede combinarse con otros dominios o moléculas de unión que reconocen unos receptores celulares en particular y/o modulan las células de una forma en particular, como por ejemplo, un modulador inmunitario (por ejemplo, interleucina(s)), un modulador del crecimiento o una citocina (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF), y particularmente, la modalidad

biespecífica del TNF mostrada en el documento U.S.S.N. 60/355.838 presentado el 13 de febrero de 2002) o una toxina (por ejemplo, ricina) o un agente o un factor antimitótico o apoptótico.

**[0037]** Las porciones Fab y F(ab')<sub>2</sub> de las moléculas de un anticuerpo puede ser preparadas mediante una reacción proteolítica con papaína y pepsina, respectivamente, con moléculas de anticuerpos sustancialmente intactas, mediante unos procedimientos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 4.342.566 a favor de Theofilopolous et al. Las porciones Fab' de la molécula de anticuerpo también son bien conocidas y se producen a partir de porciones F(ab')<sub>2</sub> seguido de una reducción de los puentes de disulfuro que unen las dos porciones de cadena pesada con mercaptoetanol, y seguido de una alquilación del mercaptano proteico resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En el presente documento se prefiere un anticuerpo que contiene moléculas de anticuerpos intactas.

**[0038]** La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene sólo una especie de sitio de combinación de anticuerpo que es capaz de inmunorreaccionar con un antígeno en particular. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal normalmente muestra una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal también puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, siendo cada uno inmunoespecífico para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

**[0039]** El término "dominio de unión al antígeno" describe la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a, y es complementaria de, parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse únicamente a una parte en particular del antígeno, parte que se denomina epítopo. Un dominio de unión al antígeno puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de un anticuerpo. Preferiblemente, un dominio de unión al antígeno comprende una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (VL) y una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (VH).

**[0040]** Los términos "MAb 806", "anticuerpo 806", "anticuerpo monoclonal 806", "ch806", "806 humanizado" pueden usarse en el presente documento de forma intercambiable. El anticuerpo MAb 806, incluyendo su generación, sus actividades en particular, las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos, los dominios de unión al antígeno, las secuencias de la región variable, son descritas y conocidas por el artesano experto, incluyendo según se proporcionan en el documento WO 02/092771; en Luwor RB et al (2001) Cancer Res 61: 5355-5361; en Mishima K et al (2001) Cancer Res 61: 5349-5354; en Johns TG et al (2002) Int J Cancer 98: 398-408; en Jungbluth AA et al (2003) Proc Natl Acad Sci 100 (2): 639-644.

**[0041]** Se prefiere que los residuos de aminoácidos descritos en el presente documento estén en la forma isómera "L". Sin embargo, los residuos de la forma isómera "D" pueden ser sustituidos por cualquier residuo de un L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada de unión a la inmunoglobulina sea conservada por el polipéptido. NH<sub>2</sub> se refiere al grupo amino libre presente en el amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el carboxi terminal de un polipéptido. Para conservar la nomenclatura estándar de polipéptidos, J. Biol. Chem., 243: 3552-59 (1969), se muestran las abreviaturas para los residuos de aminoácidos en la siguiente Tabla de Correspondencia:

TABLA DE CORRESPONDENCIA

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1-Letra	3-Letras	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina

T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	proolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

**[0042]** Debería apreciarse que todas las secuencias de los residuos de aminoácidos están representadas en el presente documento por fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la dirección convencional desde amino-terminal hacia carboxi-terminal. Adicionalmente, debería apreciarse que un punto al comienzo o al final de 5 una secuencia de un residuo de aminoácido indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos. La Tabla anterior se presenta para correlacionar las nomenclaturas de tres letras y de una letra, que pueden aparecer alternativamente en el presente documento.

**[0043]** Debería apreciarse que también están en el ámbito de las composiciones para su uso en los 10 procedimientos de la presente descripción las secuencias de ADN que codifican para y/o que expresan anticuerpos anti-EGFR eficaces, incluyendo particularmente el MAb 806 y el ch806, que codifican para anticuerpos anti-EGFR, los dominios de unión al antígeno de los mismos, o fragmentos activos de los mismos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo MAb 806 según se ha descrito públicamente y conoce el artesano experto, pero que están degenerados en las secuencias conocidas del MAb 806. Por "degenerados en" se entiende 15 que se usa un codón de tres letras diferentes para indicar un aminoácido en particular. En la materia es bien conocido que pueden usarse los siguientes codones de forma intercambiable para codificar para cada aminoácido específico:

Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
Leucina (Leu o I)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
Metionina (Met o M)	AUG
Valina (Val o V)	GUU o GUC o GUA o GUG
Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
Histidina (His o H)	CAU o CAC
Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
Ácido glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG

Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
Triptófano (Trp o W)	UGG
Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

**[0044]** Debería entenderse que los codones indicados anteriormente son para secuencias de ARN. Los correspondientes codones para el ADN tienen T sustituyendo al U.

5 **[0045]** En la secuencia del anticuerpo anti-EGFR pueden realizarse mutaciones, incluyendo en la secuencia de un anticuerpo MAb 806, de forma que se cambia un codón en particular por un codón que codifica para un aminoácido diferente. Dicha mutación se lleva a cabo generalmente realizando los menores cambios de nucleótidos posibles. Una mutación por sustitución de ese tipo puede llevarse a cabo para cambiar de una forma no conservativa un aminoácido de la proteína resultante (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o una característica en particular, por un aminoácido perteneciente a otro grupo) o de una forma conservativa (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un grupo de aminoácidos que tienen un tamaño o una característica en particular, por un aminoácido perteneciente al mismo grupo). Dicho cambio conservativo generalmente da lugar a menos cambios en la estructura y en la función de la proteína resultante. Es más probable que un cambio no conservativo altere la estructura, la actividad o la función de la proteína resultante. Debería considerarse que la presente descripción incluye secuencias que contienen cambios conservativos que no alteran significativamente las características de actividad o de unión de la inmunoglobulina ni de los anticuerpos resultantes.

20 **[0046]** De una forma análoga, se anticipa que ciertas mutaciones del EGFR, que pueden afectar o alterar, incluso significativamente, la actividad del EGFR, por ejemplo, las mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR descritas y utilizadas en el presente documento, pueden no afectar al reconocimiento, la unión o la inhibición del EGFR por parte de los anticuerpos anti-EGFR, incluyendo particularmente los anticuerpos anti-EGFR vIII mutantes, incluyendo particularmente el anticuerpo MAb 806. Por lo tanto, se anticipa que el MAb 806 puede ser eficaz de forma similar frente a otras, todavía desconocidas o no reconocidas, mutaciones del EGFR, particularmente 25 mutaciones secundarias que aparecen durante la terapia antineoplásica. Estas mutaciones pueden aparecer como resultado de la terapia de inhibición con TKI o como resultado de otras terapias para las enfermedades mediadas por el EGFR que pueden dirigirse a la actividad de cinasa o a otras actividades del EGFR.

30 **[0047]** Los aminoácidos pueden agruparse como similares o diferentes, conservados o no conservados. La agrupación de los aminoácidos puede basarse en sus grupos R (por ejemplo no polar, polar sin carga, polar cargado, aquellos con grupos fenilo), basándose en su peso molecular o en el tamaño de sus grupos R, y basándose en su peso molecular. Las sustituciones particularmente preferidas son: Lys por Arg y viceversa, de forma que puede mantenerse una carga positiva; Glu por Asp y viceversa, de forma que puede mantenerse una carga negativa; Ser por Thr, de forma que puede mantenerse un -OH libre; y Gln por Asn, de forma que puede 35 mantenerse a un NH<sub>2</sub> libre.

40 **[0048]** Las sustituciones de aminoácidos también pueden ser introducidas para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, puede introducirse una Cys en un sitio potencial para puentes de disulfuro con otra Cys. Puede introducirse una His particularmente como un sitio "catalítico" (es decir, la His puede actuar como un ácido o como una base, y es el aminoácido más habitual en la catálisis bioquímica). Puede introducirse una Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce giros β en la estructura de la proteína.

45 **[0049]** Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 70 % de los residuos de aminoácidos (preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90 o el 95 %) son idénticos, o representan sustituciones conservativas.

50 **[0050]** La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen normalmente una reacción alérgica o inapropiada similar, tales como molestias gástricas, mareos y similares, cuando son administradas a un ser humano.

55 **[0051]** La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para indicar una cantidad suficiente para la prevención, y preferentemente para la reducción en al menos aproximadamente un 20 por ciento, más preferentemente en al menos aproximadamente un 30 por ciento, aun más preferentemente en al menos aproximadamente un 50 por ciento, más preferentemente en al menos aproximadamente un 70 por ciento, más

preferentemente en al menos aproximadamente un 90 por ciento, de un cambio clínicamente significativo en la actividad en fase S de una masa celular objetivo, o un cambio significativo en el tamaño o en la dimensión de una masa celular o tumoral objetivo, u otra característica de la patología que pueda atender a su presencia y su actividad.

5

**[0052]** El anticuerpo o el fragmento activo puede formularse en la composición terapéutica en forma de sales neutralizadas farmacéuticamente aceptables. Algunas sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la molécula del polipéptido o del anticuerpo) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como 10 acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férricos, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares.

15 **[0053]** Las composiciones que contienen el anticuerpo terapéutico o un fragmento activo se administran convencionalmente por vía intravenosa, tal como mediante la inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término "dosis unitaria", cuando se usa en relación con una composición terapéutica de la presente descripción, se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para seres humanos, conteniendo cada una, una cantidad predeterminada del material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en 20 asociación con el diluyente requerido; es decir, un portador o un vehículo.

Las composiciones se administran de una forma compatible con la formulación de la dosis, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se va a tratar, de la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para utilizar el principio activo y el grado de inhibición deseado o de la cantidad de masa tumoral a la que se dirige. Las cantidades precisas de principio activo requeridas para su administración 25 dependen del juicio del profesional médico, y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las dosis adecuadas pueden variar desde aproximadamente 0,1 hasta 20, preferentemente desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 10, y más preferentemente desde uno hasta varios miligramos del principio activo por kilogramo de peso corporal del individuo por día, y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de recuerdo también son variables, pero están tipificadas por una administración 30 inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una hora o más mediante una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, se contempla una infusión intravenosa continua suficiente para mantener las concentraciones en sangre entre diez nanomolar y diez micromolar.

**[0054]** Según se usa en el presente documento, "pg" significa picogramo, "ng" significa nanogramo, "ug" o 35 "µg" significa microgramo, "mg" significa miligramo, "ul" o "µl" significa microlitro, "ml" significa mililitro, "l" significa litro.

**[0055]** En un esfuerzo por caracterizar adicionalmente la aplicación del MAb 806 en la terapia oncológica mediada por el EGFR, la presente descripción describe el uso del MAb 806 para el tratamiento de ratones 40 modificados genéticamente con tumores de pulmón que estaban dirigidos por mutaciones en el EGFRvIII o en el dominio de la cinasa del EGFR. Cada una de estas mutaciones es químicamente relevante y significativa para la enfermedad mediada por el EGFR, particularmente el cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello y glioblastoma. La presente descripción confirma que el anticuerpo anti-EGFR vIII, particularmente el MAb 806, es notablemente eficaz en el bloqueo de la señalización del EGFRvIII y 45 en la inducción de la apoptosis de las células tumorales, dando como resultado una regresión drástica del tumor en los cánceres de pulmón murinos dirigidos por el EGFRvIII. Un anticuerpo característico dirigido al EGFR, creado contra las células que expresan unos elevados niveles del EGFR natural, el cetuximab, no consiguió mostrar actividad en estos tumores de pulmón definidos genéticamente. Además, el tratamiento de los tumores de pulmón murinos dirigidos por una mutación reconocida y clínicamente relevante del EGFR en el dominio de la cinasa 50 (L858R) con el MAb 806 indujo una regresión significativa del tumor. Se ha demostrado que esta mutación en el dominio de la cinasa es sensible a la terapia con TKI, particularmente con gefitinib o con erlotinib. La resistencia adquirida a los TKI, incluyendo tanto a gefitinib como a erlotinib, es un reto continuo, y los tumores que son sensibles a los TKI finalmente progresan a pesar de continuar. Esta resistencia adquirida puede estar mediada por una resistencia secundaria o por mutaciones compensadoras, particularmente una mutación secundaria en la posición 55 790 del EGFR (T790M). Los investigadores demuestran ahora que el anticuerpo anti-EGFR, particularmente el MAb 806, es eficaz frente a la mutación T790M, dando como resultado una regresión drástica del tumor en los cánceres de pulmón murinos dirigidos por el EGFR T790M/L858R. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el anticuerpo anti-EGFR, particularmente el MAb 806, proporciona una alternativa o un adjunto eficaz en el tratamiento de pacientes con mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR, incluyendo pacientes oncológicos,

particularmente en los pacientes con cáncer de pulmón.

**[0056]** Por lo tanto, se proporcionan aplicaciones y procedimientos tanto terapéuticos como diagnósticos, y surgen por la demostración de la actividad antitumoral del anticuerpo anti-EGFR, particularmente del MAb 806.

5 Como se ha sugerido anteriormente, y se elaborará adicionalmente en el presente documento, la presente descripción contempla la intervención farmacéutica en la cascada de reacciones y en la señalización en las que está implicado el EGFR, para modular la capacidad oncogénica asociada a las mutaciones del EGFR, incluyendo las mutaciones en el dominio de la cinasa, mutaciones resistentes tanto primarias como secundarias.

10 **[0057]** Los datos proporcionados en el presente documento demuestran la actividad del MAb 806 frente a las mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR, incluyendo la L858R y la T790M resistentes a los TKI. Se anticipa que puedan existir o aparecer mutaciones adicionales en el dominio de la cinasa o mutaciones secundarias en el EGFR con la continuidad del avance de la terapia dirigida con anti-EGFR. El inhibidor irreversible HKI272, que se une al EGFR en la cisteína 797 (que se corresponde con la cisteína 530 en los mutantes de delección del EGFR viii), 15 está avanzando en los protocolos preclínicos. Son probables mutaciones secundarias resistentes con sustituciones en la cisteína si no se anticipan. Estos mutantes secundarios adicionales del EGFR serían candidatos para la terapia con el anticuerpo anti-EGFR.

20 **[0058]** La descripción proporciona por lo tanto un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad mediada por el EGFR resistente a un inhibidor de la cinasa de tirosina en un mamífero, en el que dicha enfermedad resistente mediada por el EGFR es el resultado de una mutación secundaria en el EGFR para generar un EGFR mutante, y en el que dicha mutación es distinta de la mutación EGFR viii, que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EGFR capaz de unirse a, y de inhibir, el EGFR mutante. En 25 un caso particular, la mutación secundaria del EGFR es una mutación en el dominio de la cinasa de tirosina del EGFR. En un paso adicional, la mutación en el dominio de la cinasa de tirosina es la T790M. En un caso particular del procedimiento, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo MAb 806 o un fragmento activo del mismo. El MAb 806 incluye un anticuerpo murino, un anticuerpo recombinante o un anticuerpo humanizado. Pueden utilizarse 30 anticuerpos adicionales anti-EGFR, incluyendo aquellos dirigidos al EGFRviii mutante, en los procedimientos terapéuticos de la descripción. Algunos anticuerpos anti-EGFR ejemplares y conocidos pueden seleccionarse entre ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A4 y o fragmentos activos de los mismos.

**[0059]** La enfermedad mediada por el EGFR para su tratamiento es particularmente un cáncer, y puede seleccionarse entre glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de riñón, 35 cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. En un caso particular, el cáncer mediado por el EGFR es adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón epidermoide o cáncer de pulmón no microcítico.

40 **[0060]** La descripción incluye un procedimiento para la reducción del crecimiento de un tumor mediado por el EGFR en un paciente con cáncer, en el que dicho paciente con cáncer ha sido tratado previamente con uno o más inhibidores de la cinasa de tirosina y ha desarrollado una enfermedad recurrente y un crecimiento del tumor, que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-EGFR de forma que la enfermedad y el crecimiento del tumor recurrentes se inhiben y se reducen. En un caso particular del procedimiento para la reducción del crecimiento del tumor, el anticuerpo anti-EGFR es el anticuerpo MAb 806 o un fragmento activo 45 del mismo. El MAb 806 incluye un anticuerpo murino, un anticuerpo recombinante o un anticuerpo humanizado. Pueden utilizarse anticuerpos adicionales anti-EGFR, incluyendo aquellos dirigidos al EGFRviii mutante. Algunos ejemplos de anticuerpos anti-EGFR conocidos pueden seleccionarse entre ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A4 y o fragmentos activos de los mismos.

50 **[0061]** En un caso clínico en particular, la enfermedad y el crecimiento del tumor recurrentes en el paciente con cáncer son el resultado de una mutación secundaria en el EGFR que es una mutación en el dominio de la cinasa de tirosina del EGFR. Una mutación secundaria en particular del EGFR es la mutación en el dominio de la cinasa de tirosina T790M.

55 **[0062]** La descripción también proporciona un procedimiento para el tratamiento de un cáncer mediado por el EGFR en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de un inhibidor de la cinasa de tirosina y de un anticuerpo anti-EGFR. En un caso, el inhibidor de la cinasa de tirosina y el anticuerpo anti-EGFR se administran simultáneamente. En otro caso, el inhibidor de la cinasa de tirosina y el anticuerpo anti-EGFR se administran simultáneamente o sucesivamente y repetidamente, antes o después de una quimioterapia tradicional.

**[0063]** La descripción también proporciona un procedimiento para el tratamiento de un cáncer mediado por el EGFR en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de un inhibidor de la cinasa de tirosina y de un anticuerpo anti-EGFR, en el que dicho anticuerpo anti-EGFR es administrado después del tratamiento con el 5 inhibidor de la cinasa de tirosina como terapia de segunda línea para inhibir potenciales EGFR mutantes secundarios resistentes a los inhibidores de la cinasa de tirosina.

**[0064]** El inhibidor de la cinasa de tirosina puede ser un inhibidor reversible de la cinasa de tirosina o un 10 inhibidor irreversible de la cinasa de tirosina. El inhibidor reversible de la cinasa de tirosina puede ser una aniliniquinazolina y seleccionarse entre gefitinib, erlotinib, AG1478, ST1571 y SU-6668. Algunos ejemplos de inhibidores irreversibles de la cinasa de tirosina son conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, EKB- 569, EKI-569, HKI-272, HKI-357 y BIBW 2992 (Kwak EL et al (2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102 (21): 7665-70).

**[0065]** Los cánceres mediados por el EGFR pueden seleccionarse entre glioblastoma, cáncer de cabeza y 15 cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga. En particular, el cáncer es adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón epidermoide o cáncer de pulmón no microcítico.

**20 [0066]** El anticuerpo anti-EGFR, particularmente el MAb 806, puede ser administrado en los procedimientos solo o junto con otros anticuerpos anti-EGFR. Por lo tanto, el MAb 806 puede ser administrado en serie o junto con cetuximab. El MAb 806 también puede ser administrado en serie o junto con otros anticuerpos anti-EGFR vIII, incluyendo ABX-EGF (panitumumab), DH8.3, L8A4 y o fragmentos activos de los mismos.

**25 [0067]** El (los) anticuerpo(s) anti-EGFR puede(n) prepararse en composiciones farmacéuticas, con un portador adecuado y a una dosis eficaz para su administración mediante diversas vías a un paciente. Pueden utilizarse diversas técnicas de administración, entre las cuales están las técnicas parenterales tales como las inyecciones o cutáneas, intravenosas e intraperitoneales, las cateterizaciones y similares. Las cantidades del anticuerpo o de sus fragmentos activos pueden variar, y en particular deberían basarse en las recomendaciones y 30 en la prescripción del profesional médico veterinario cualificado, incluyendo tras la consideración de los resultados y los datos proporcionados en el presente documento.

**[0068]** Los anticuerpos anti-EGFR de uso en la descripción, incluyendo el MAb 806, pueden proporcionar 35 aplicaciones diagnósticas útiles, incluyendo aplicaciones de imagen o aplicaciones de biopsias diagnósticas, para el diagnóstico y/o la monitorización de pacientes oncológicos, incluyendo después de la finalización de una terapia con TKI.

**[0069]** Los marcas empleados habitualmente para estos estudios son elementos radioactivos, enzimas, 40 productos químicos que fluorescen cuando se exponen a luz ultravioleta, y otros. Como marcas se conocen y pueden utilizarse diversos materiales fluorescentes. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, rojo Texas, azul AMCA y amarillo Lucifer.

**[0070]** Los anticuerpos de la descripción puede marcarse con un marcaje detectable o funcional. Algunos marcas detectables incluyen, pero no se limitan a, radiomarcas tales como los isótopos  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ , 45  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{121}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{99}\text{Tc}$  y  $^{186}\text{Re}$ , que pueden unirse a los anticuerpos de la descripción mediante el uso de la química convencional conocida en la materia de obtención de imágenes con anticuerpos. Los marcas también incluyen marcas fluorescentes y los marcas usados habitualmente en la materia para la obtención de imágenes mediante RMN-TC. También incluyen marcas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante. Los marcas incluyen adicionalmente fracciones químicas, 50 tales como la biotina, que pueden ser detectadas a través de su unión a una fracción detectable análoga específica, por ejemplo, avidina marcada.

**[0071]** Los marcas funcionales incluyen sustancias que están diseñadas para ser dirigidas al sitio de un tumor para provocar la destrucción del tejido tumoral. Dichos marcas funcionales incluyen fármacos citotóxicos, 55 tales como 5-fluorouracilo o ricina, y enzimas tales como la carboxipeptidasa o la nitrorreductasa bacterianas, que son capaces de convertir los profármacos en fármacos activos en el sitio de un tumor.

**[0072]** Los anticuerpos anti-EGFR radiomarcados y los fragmentos de los mismos son útiles en técnicas diagnósticas *in vitro* y en técnicas de radioimagen *in vivo* y en radioinmunoterapia. En el caso de las imágenes *in*

- vivo, los miembros de unión específicos de la presente descripción pueden conjugarse con un agente de imagen en lugar de con radioisótopo(s), que incluyen, pero no se limita a, un agente potenciador de las imágenes por resonancia magnética, en la que se carga, por ejemplo, una molécula de un anticuerpo con un gran número de iones paramagnéticos a través de grupos quelantes. Algunos ejemplos de grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, 5 éteres en corona de poliaminas y polioximas. Algunos ejemplos de iones paramagnéticos incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y ferbio. En un paso adicional de la descripción, los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente los anticuerpos y los fragmentos de los mismos, particularmente los radioinmunconjungados, son útiles en la radioinmunoterapia, particularmente en forma de anticuerpos radiomarcados para la terapia oncológica. En un paso adicional más, los miembros de unión específica 10 radiomarcados, particularmente los anticuerpos y los fragmentos de los mismos, son útiles en las técnicas de cirugía radioinmunoguiada, en las que pueden identificar e indicar la presencia y/o la ubicación de las células cancerosas, de las células precancerosas, de las células tumorales y de las hiperproliferativas, antes, durante o después de la cirugía, para la eliminación de dichas células.
- 15 [0073] Los inmunoconjungados o las proteínas de fusión de anticuerpos de la presente descripción, en los que los miembros de unión específica, particularmente los anticuerpos y los fragmentos de los mismos, de la presente descripción, están conjugados o unidos a otras moléculas como agentes, incluyen adicionalmente, pero no se limitan a, miembros de unión conjugados con un agente de ablación química, con una toxina, con un inmunomodulador, con un citocina, con un agente citotóxico, con un agente quimioterapéutico o con un fármaco.
- 20 [0074] La radioinmunoterapia (RAIT) ha entrado en la clínica y demostrado su eficacia mediante el uso de diversos inmunoconjungados de anticuerpos. Se ha evaluado el anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) hMN-14 humanizado marcado con  $^{131}\text{I}$  en el cáncer colorrectal (Behr TM et al (2002) Cancer 94 (4 Supl.): 1373-81) y se ha evaluado el mismo anticuerpo marcado con  $^{90}\text{Y}$  en el carcinoma medular de tiroides (Stein R et al 25 (2002) Cancer 94 (1): 51-61). La radioinmunoterapia mediante el uso de anticuerpos monoclonales también se ha evaluado y notificado para el linfoma no Hodgkin y para el cáncer de páncreas (Goldenberg DM (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39 (1-2): 195-201; Gold DV et al (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39 (1-2) 147-54). Los procedimientos de radioinmunoterapia con algunos anticuerpos en particular también se describen en las Patentes de EE.UU. 6.306.393 y 6.331.175. La cirugía radioinmunoguiada (RIGS) también ha entrado en la clínica y demostrado su 30 eficacia y utilidad, incluyendo mediante el uso de anticuerpos anti-CEA y de anticuerpos dirigidos contra los antígenos asociados a tumores (Kim JC et al (2002) Int J Cancer 97 (4): 542-7; Schneebaum S et al (2001) World J Surg 25 (12): 1495-8; Avital S et al (2000) Cancer 89 (8): 1692-8; McIntosh DG et al (1997) Cancer Biother Radiopharm 12 (4): 287-94).
- 35 [0075] Los anticuerpos de la presente descripción puede ser administrados a un paciente en necesidad de tratamiento a través de cualquier vía adecuada, habitualmente mediante una inyección en el torrente sanguíneo o en el LCR, o directamente en el sitio del tumor. La dosis precisa dependerá de varios factores, que incluyen si el anticuerpo es para un diagnóstico o para un tratamiento, el tamaño y la ubicación del tumor, la naturaleza precisa del anticuerpo (si es un anticuerpo completo, un fragmento, un diacuerpo, etc.), y de la naturaleza del marcaje 40 detectable o funcional unido al el anticuerpo. Cuando se usa un radionúclido para la terapia, una dosis individual máxima adecuada es de 45 mCi/m<sup>2</sup>, hasta un máximo de aproximadamente 250 mCi/m<sup>2</sup>. La dosis preferible está en el intervalo de entre 15 y 40 mCi, con un intervalo de dosificación adicionalmente preferido de entre 20 y 30 mCi, o de entre 10 y 30 mCi. Dicha terapia puede requerir una sustitución de células madre de la médula ósea. Una dosis de anticuerpo típica para obtener imágenes de un tumor o para tratar un tumor estará en el intervalo de desde 0,5 45 hasta 40 mg, preferentemente desde 1 hasta 4 mg de anticuerpo en la forma F(ab')<sub>2</sub>. Es preferible administrar los anticuerpos desnudos en dosis de entre 20 y 1.000 mg de proteína por dosis, o de entre 20 y 500 mg de proteína por dosis, o de entre 20 y 100 mg de proteína por dosis. Esta es una dosis para un tratamiento individual de un paciente adulto, que puede ser ajustada proporcionalmente para niños y bebés, y también puede ajustarse para otros 50 formatos de anticuerpos en proporción con el peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, bisemanales, semanales o mensuales, a discreción del profesional médico.
- [0076] La invención puede comprenderse mejor mediante referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con objeto de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención y no deben ser interpretados, sin embargo, como 55 limitantes del amplio ámbito de la invención.

#### EJEMPLO 1

El anticuerpo terapéutico anti-EGFR 806 genera respuestas en carcinomas de pulmón murinos *de novo*

### dependientes del EGFR mutante

**[0077]** En el cáncer de pulmón no microcítico humano (NSCLC) se producen mutaciones activadoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), teniendo un 5 % de las células del carcinoma de pulmón humano mutaciones *EGFRvIII*, y teniendo un 10 ~ 30 % de los adenocarcinomas de pulmón mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR. Un anticuerpo monoclonal dirigido al EGFR, el MAb 806, reconoce un epítopo conformacional del EGFR natural (wt), así como el mutante truncado EGFRvIII. Para explorar el espectro antineoplásico de este anticuerpo para una terapia oncológica dirigida al EGFR, se usó el MAb 806 para tratar ratones modificados genéticamente con tumores de pulmón que estaban dirigidos por el *EGFRvIII* o por mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR. Nuestros resultados demuestran que el MAb 806 es notablemente eficaz en el bloqueo de la señalización del *EGFRvIII* y en la inducción de una apoptosis en las células tumorales, y por lo tanto, da como resultado una regresión drástica del tumor en los cánceres de pulmón murinos dirigidos por el *EGFRvIII*. Otro anticuerpo dirigido al EGFR, el cetuximab, no consiguió mostrar actividad en estos tumores de pulmón definidos genéticamente. Adicionalmente, el tratamiento de los tumores de pulmón murinos dirigidos por la mutación del EGFR en el dominio de la cinasa con el MAb 806 indujo una significativa regresión del tumor, aunque con un menor grado que el observado en los tumores dirigidos por el *EGFRvIII*. Tomados en conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que el MAb 806 puede proporcionar una actividad significativa en el tratamiento de la población de pacientes con NSCLC con estas dos clases de mutaciones en el EGFR.

## 20 Introducción

**[0078]** La terapia oncológica dirigida está diseñada para disruptir la función de moléculas específicas necesarias para la carcinogénesis y el crecimiento del tumor, y por lo tanto destruyen o impiden el crecimiento de las células cancerosas (1). Al contrario que la quimioterapia citotóxica convencional, dichas terapias oncológicas dirigidas pueden ser más eficaces y menos perjudiciales para las células normales. Un importante esfuerzo en el campo de la terapia oncológica dirigida ha sido el desarrollo de agentes que se dirigen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR es un miembro de la familia ErbB de receptores estrechamente relacionados, que incluyen el EGFR (ErbB-1), el Her2/neu (ErbB- 2), el Her3 (ErbB-3) y el Her4 (ErbB-4). La activación del EGFR da lugar a la activación de la cinasa de tirosina del receptor y a una serie de acontecimientos de señalización cascada abajo que median en la proliferación, la motilidad, la adhesión, la invasión y la resistencia de las células a la quimioterapia, así como en la inhibición de la apoptosis (2-4), procesos que son cruciales para la continua proliferación y supervivencia de las células cancerosas.

**[0079]** Hasta la fecha, dos importantes agentes anti-EGFR han entrado en el entorno clínico: los anticuerpos anti-EGFR y los inhibidores de la cinasa de tirosina (TKI) del EGFR de molécula pequeña (5, 6). Los anticuerpos anti-EGFR, tales como el cetuximab, se diseñaron para unirse al dominio extracelular del EGFR y bloquear la activación de la señalización cascada abajo del EGFR (7). Por el contrario, los TKI de molécula pequeña, tales como el gefitinib o el erlotinib, compiten con el ATP por la unión al dominio catalítico intracelular de la cinasa de tirosina del EGFR, y por lo tanto previenen el autofosforilación del EGFR y la señalización cascada abajo (4).

**[0080]** Estos dos grupos de fármacos anti-EGFR han mostrado una cierta eficacia clínica en un subconjunto de pacientes con una diversidad de diferentes tipos de cánceres. El tratamiento con gefitinib o con erlotinib en pacientes con cáncer de pulmón que tienen mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR a menudo generan unas respuestas clínicas drásticas (5, 8). Sin embargo, la eficacia del gefitinib o del erlotinib en el adenocarcinoma de pulmón con un EGFR natural o de otro subtipo histológico, tal como el carcinoma epidermoide, es limitada (9, 10). Adicionalmente, se ha demostrado en ensayos preclínicos y clínicos que el gefitinib o el erlotinib son bastante ineficaces en la inhibición de la función del *EGFRvIII* mutante (11), una mutación activadora característica del EGFR en la que hay una delección en marco desde el exón II hasta el VII. El *EGFRvIII* se encuentra habitualmente en los glioblastomas, recientemente se ha averiguado que está presente en un subconjunto de carcinomas de pulmón epidermoides humanos (12) y en una gran fracción de los cánceres de cabeza y cuello (13). Se ha demostrado que el cetuximab es eficaz en un pequeño subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), y en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, así como en pacientes con cáncer colorrectal. Sin embargo, la respuesta al cetuximab no parece estar correlacionada con los niveles de expresión del EGFR. Por lo tanto, no está claro por qué estos pacientes responden mientras que otros pacientes con cáncer cuyos tumores tienen una elevada expresión del EGFR son resistentes al tratamiento con cetuximab (14).

**[0081]** En una realización, el MAb 806 es un anticuerpo murino, creado originalmente para reconocer el mutante de truncamiento único, el *EGFRvIII* (15-17). De forma importante, el epítopo reconocido por el MAb 806 no es accesible en el EGFR natural (wt), pero es expresado en la forma transicional del EGFR wt en las células con una

sobreexpresión del EGFR, y con una expresión del EGFRvIII (18). Los estudios de epítopos están apoyados por estudios inmunohistoquímicos que demuestran que el anticuerpo 806 se une a los epítopos presentes en los gliomas, así como a un amplio abanico de cánceres epiteliales, pero no a los tejidos humanos normales (16, 19). Estos y otros datos preclínicos sugieren que el MAb 806 podría tener un espectro diferente de actividad clínica y un perfil de efectos laterales distinto a los del cetuximab y a los de otros anticuerpos anti-EGFR. En modelos de xenoinjertos, el MAb 806 ha mostrado una potente actividad antitumoral, sin ningún direccionamiento a los tejidos normales. Por lo tanto, las capacidades de direccionamiento únicas del MAb 806 representan un nuevo paradigma para la terapia molecular dirigida específica para el cáncer.

10 **[0082]** Algunos estudios recientes han demostrado que un 10-30 % de los pacientes con NSCLC tienen mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR, mientras que un 5 % de los pacientes con carcinoma de pulmón epidermoide (SCC) tienen una mutación en el dominio extracelular del EGFRvIII (12, 20). Para investigar el potencial clínico del MAb 806 en la terapia dirigida específica para el cáncer en pacientes con NSCLC portadores de mutaciones en el EGFR, utilizamos dos modelos establecidos de cáncer de pulmón de ratón que son dependientes 15 de las mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFRvIII o del EGFR. Nuestros datos demuestran que el MAb 806 es muy eficaz en el tratamiento del NSCLC murino dirigido por la expresión de la mutación del EGFRvIII o del EGFR en el dominio de la cinasa, y sugieren que es probable que este anticuerpo tenga actividad clínica en pacientes cuyos tumores tienen una mutación similar.

## 20 Resultados

### El tratamiento con el MAb 806, pero no con cetuximab, induce una regresión del tumor en ratones portadores de tumores con una mutación EGFRvIII

25 **[0083]** Algunos estudios previos han establecido el papel esencial de la mutación EGFRvIII en el mantenimiento del tumor en tumores de pulmón murinos dirigidos por la mutación. El bloqueo de la activación del EGFRvIII da como resultado una drástica regresión del tumor asociada a una apoptosis en el modelo de cáncer de pulmón murino *de novo* (12). Los ratones *Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-/-* desarrollaron adenocarcinomas de pulmón con características de un carcinoma bronquiolalveolar (BAC) después de 8 ~ 10 semanas de 30 administración de doxiciclina, (Figura 1, panel izquierdo; Figura 2A, panel superior). Después de que los ratones portadores del tumor fueran identificados mediante imágenes de RMN, se administraron 0,5 mg por dosis del MAb 806 a través de una inyección intraperitoneal (I.P.) Diariamente durante la primera semana, y después cada dos días durante las siguientes 4 semanas. Se obtuvieron imágenes sucesivas de RMN al final de los tratamientos de 1, de 3 y de 5 semanas para determinar los cambios en el volumen y/o en la densidad del tumor. La reducción del tumor era 35 notable en las imágenes de RMN después de 1 semana de tratamiento con el MAb 806 (reducción media del 60 % ± 5 % entre los 6 ratones, Figura 1, panel superior). La carga tumoral continuó disminuyendo después de 3 semanas de tratamiento (reducción media del 95 % ± 8 %), y los 6 ratones tenían una regresión tumoral completa después de 5 semanas de tratamiento. Por el contrario, el tratamiento de los ratones con cetuximab fue incapaz de inducir la regresión del tumor en 4 ratones *Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-/-* incluso después de 5 semanas de 40 tratamiento a 1 mg por ratón con el mismo programa de dosificación. También observamos que los ratones tratados con cetuximab se volvían progresivamente más delicados y que incluso algunos sucumbieron debido a la significativa carga tumoral durante el periodo de tratamiento (datos no mostrados).

50 **[0084]** El análisis patológico de los pulmones de estos ratones se correlacionaba con los hallazgos de las imágenes por RMN: había presente una disminución en la celularidad del tumor en los adenocarcinomas después de una semana de tratamiento con el MAb 806 (Figura 2A, panel central). Después de 5 semanas, los pulmones tenían fibrosis y cicatrices focales, con escasos infiltrados de células monocíticas; representando potencialmente áreas de remodelado continuo a partir de los tumores en regresión (Figura 2A, panel inferior). Aunque todavía podían observarse raramente células cancerosas vivas en numerosos focos de estos nódulos fibróticos, la mayor parte del área con fibrosis y cicatrices no contenía ninguna célula tumoral. Por el contrario, los tumores de los ratones tratados con cetuximab parecían no estar afectados, sin ninguna diferencia histológica visible cuando se comparaban con los tumores sin tratar (datos no mostrados). Por lo tanto, el tratamiento con el anticuerpo MAb 806 dio lugar a una regresión del tumor rápida y drástica en el modelo de cáncer de pulmón de ratón dirigido por el *EGFRvIII*, mientras que el tratamiento con cetuximab era bastante ineficaz.

55 **El MAb 806 inhibe la fosforilación del EGFRvIII e induce la apoptosis de las células tumorales en ratones *Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-/-***

**[0085]** Para determinar si el MAb 806 que se administró por vía intraperitoneal reconocía su objetivo en los

tumores pulmonares, llevamos a cabo una tinción inmunohistoquímica de los tumores de los pulmones de los ratones tratados con o sin el MAb 806 mediante el uso de anticuerpos contra el EGFR total y el fosfo-EGFR. Como se esperaba, el tratamiento con el MAb 806 no tuvo ningún impacto en la expresión total del EGFRvIII en las células tumorales (Figura 2B). Sin embargo, la expresión del fosfo-EGFRvIII disminuyó después de 1 semana de tratamiento 5 con el MAB 806 (Figura 2B). A continuación confirmamos estos hallazgos mediante un análisis por inmunotransferencia mediante el uso de lisados de pulmón recogidos en diferentes puntos temporales durante el tratamiento con el MAB 806. El nivel del fosfo-EGFRvIII disminuyó drásticamente después de 1 semana de tratamiento con el MAB 806, mientras que el nivel total de EGFRvIII permaneció similar al de los controles sin tratar (Figura 3), lo que indica un fuerte efecto inhibidor del mAB806 sobre la fosforilación del EGFRvIII. De forma 10 interesante, el nivel total de EGFRvIII finalmente disminuyó después de 5 semanas de administración del mAB806. Una explicación para esto podría ser la drástica disminución del número de células tumorales viables. Coherente con esta interpretación, se observó un importante aumento en la tinción TUNEL en los tumores de pulmón después de 1 semana de tratamiento con el mAB806 en comparación con los tumores sin tratar (Fig. 2C). Aparte de los cambios en el nivel de fosfo-EGFR, 1 semana de tratamiento con el mAB806 también disminuyó la 15 expresión del fosfo-Akt y del fosfo-Erk1,2, estas moléculas de señalización cascada abajo del EGFR están asociadas funcionalmente con rutas antiapoptóticas y de proliferación. Sorprendentemente, hemos observado un aumento débil pero reproducible en el nivel de fosfo-Akt después de 5 semanas de tratamiento con el mAB806 cuando se compara con 1 semana de tratamiento. Es poco probable que esta fosforilación del Akt sea iniciada por el EGFRvIII, ya que el fosfo-EGFRvIII está bajo en este punto temporal. Posiblemente, el Akt podría ser activado por 20 otros acontecimientos de señalización que estaban implicados en el proceso de remodelado pulmonar. Estos datos sugieren que el mAB806 indujo una regresión en el tumor en los ratones con EGFRvIII mediante un bloqueo de la activación del EGFR y un aumento en la apoptosis de las células tumorales.

#### El tratamiento con el Ch806 da lugar a una regresión drástica del tumor en tumores de pulmón murinos con 25 la mutación EGFRvIII

**[0086]** El Ch806 es una forma humanizada del mAB806 (22). Para determinar si el anticuerpo humanizado podría ser tan eficaz como el mAB806 murino en el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón *in vivo*, tratamos ratones *Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-/-* portadores del tumor con una dosis de 0,5 mg del ch806 mediante 30 una inyección I.P. diaria durante la primera semana, y después una dosis cada dos días durante otras 7 semanas. Se obtuvieron imágenes de estos ratones a las 1,5, 5 y 8 semanas de tratamiento, y después se sacrificaron para los análisis histológicos. Observamos una drástica reducción en el volumen del tumor mediante el escáner de RMN a partir de las 1,5 semanas de tratamiento ( $43\% \pm 3\%$ ), y se consiguió una regresión del tumor prácticamente completa ( $83\% \pm 7\%$ ) a las 8 semanas de tratamiento en cada uno de los 4 ratones que estaban siendo tratados 35 con el ch806 (Figura 1, panel inferior). La histología de los ratones tratados con el ch806 (datos no mostrados) era similar a la de los tumores después del tratamiento con el mAB806, y era coherente con los datos de las imágenes de RMN.

#### El Ch806 es eficaz en el tratamiento de tumores de pulmón murinos con la mutación L858R del EGFR 40

**[0087]** Para abordar si el ch806 podría ser eficaz en el cáncer de pulmón dirigido por la mutación en el dominio de la cinasa del EGFR, se emplearon ratones *EGFR L858R-IRES-Luciferase/CCSP-rtTA*. El Ch806 se administró a 0,5 mg/ratón cada día durante 4 semanas y se obtuvieron imágenes sucesivas de un escáner de RMN de todos los ratones tratados al final de las 1, 2 y 4 semanas de tratamiento. Se observó una regresión del tumor 45 después de 2 semanas de tratamiento con el ch806 ( $21\% \pm 2\%$ ) y era de un  $41\% \pm 2\%$  a las 4 semanas de tratamiento con el ch806 (Figura 4A). Microscópicamente, los pulmones de los ratones tratados con el ch806 mostraban un aumento en el infiltrado celular difuso con macrófagos, especialmente en las áreas que rodean al resto de los tumores viables. Adicionalmente, había macrófagos presentes en múltiples áreas de los tumores, lo que sugiere que la citotoxicidad mediada por macrófagos podría ser uno de los mecanismos subyacentes en la regresión 50 del tumor inducida por el anticuerpo (Figura 4B). También debería apreciarse que la presencia de una consolidación en el pulmón debido a un aumento en la acumulación de macrófagos asociados con las células tumorales podría sobreestimar el volumen del tumor en las imágenes de RMN.

#### Análisis

**55 [0088]** Las mutaciones en el EGFR y los acontecimientos de activación son habituales en los tumores humanos, incluyendo en el NSCLC. La activación de la señalización del EGFR puede producirse a través de la sobreexpresión del receptor, así como por una señalización constitutiva debido a las formas mutantes con ganancia de función del EGFR. Aproximadamente un 10-30 % de los pacientes con NSCLC tienen mutaciones en el dominio

de la cinasa del EGFR en sus tumores de pulmón, y aproximadamente un 5 % de los pacientes con cáncer de pulmón epidermoide tienen la mutación específica del dominio extracelular del *EGFRvIII* (12, 20). Aquí demostramos que el mAB806 , y su forma humanizada, el ch806, son eficaces en el tratamiento de cánceres de pulmón murinos con ambos tipos de mutaciones del EGFR. La drástica regresión tumoral observada se asoció con el bloqueo de la señalización del *EGFRvIII*, y consecuentemente, con un aumento en la apoptosis. La respuesta al ch806 no era tan impresionante como la notificada para el erlotinib y para el cetuximab, en ratones con tumores de pulmón que tienen mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR, aunque sí tenían una respuesta objetiva (41 % ± 2 %) radiográfica e histológicamente (21, 23). Por el contrario, se consiguió una regresión tumoral prácticamente completa en los ratones con tumores de pulmón dirigidos por el *EGFRvIII* después del tratamiento con el mAB806 , mientras que el cetuximab no tuvo efecto. Este último resultado quizás no es sorprendente dado que el cetuximab está diseñado para interferir en la interacción entre el ligando y el dominio extracelular del EGFR (24). Se ha establecido que la mutación del *EGFRvIII* da lugar a cambios conformacionales y muestra una actividad de cinasa constitutiva independiente de la estimulación del ligando que contribuye a la formación del tumor (25). Aunque el cetuximab ha sido aprobado por la FDA para los pacientes con cáncer, no existe un biomarcador claro para predecir la eficacia del tratamiento con este anticuerpo en pacientes individuales, dado que los índices de respuesta y la supervivencia global no se correlacionan con la expresión de la proteína EGFR mediante una inmunohistoquímica (14).

**[0089]** Aunque los TKI de molécula pequeña son eficaces en el tratamiento de muchos pacientes con NSCLC con mutaciones en el dominio de la cinasa del EGFR, todos los pacientes desarrollan finalmente una resistencia asociada con una mutación secundaria, la T790M (10, 26). Coherentemente, los estudios *in vitro* han demostrado que las células tumorales con mutaciones T790M son resistentes al tratamiento con erlotinib (27, 28). Las pruebas a partir de la estructura cristalina del dominio de la cinasa del EGFR con una mutación secundaria T790M indican que debería haber poco efecto de la mutación T790M sobre la función del receptor. Puede ser que la mutación del T790M interfiera con el erlotinib en su unión al bolsillo de la ATPasa (27). No obstante, el dominio extracelular del mutante de T790M proporciona potencialmente un buen objetivo para la terapia oncológica basada en anticuerpos, incluyendo el cetuximab y el mAB806 . Esto podría significar que los tumores de NSCLC con mutaciones puntuales secundarias T790M, que son resistentes al tratamiento con TKI pequeños, podrían responder al tratamiento con el mAB806 . Se están realizando esfuerzos para generar ratones portadores de los alelos mutantes compuestos de *EGFR* que contienen ambas mutaciones activadoras, en el dominio de la cinasa y la mutación T790M, con objeto de poner a prueba esta hipótesis.

**[0090]** Recientemente se han conocido datos a partir de un ensayo clínico en Fase I que muestran que el anticuerpo ch806, al contrario que el cetuximab, se une selectivamente a las células tumorales de los cánceres de pulmón, incluyendo el carcinoma de pulmón epidermoide, pero no a los tejidos normales (Scott, ASCO 2006). No se observó una toxicidad significativa del anticuerpo ch806 en este ensayo. En comparación con otras terapias oncológicas dirigidas al EGFR, incluyendo los tratamientos con cetuximab y con TKI, parece que el ch806 tiene una especificidad mucho mayor, mediante su direccionamiento al epítopo conformacionalmente dependiente del EGFR de las células cancerosas, siendo moderado con el EGFR wt de la mayoría, si no de todas, las células normales. Nuestros resultados indican claramente la eficacia del mAB 806 en el bloqueo de la señalización del EGFR. Por lo tanto, las capacidades únicas de direccionamiento del ch806 representan un nuevo y excitante paradigma para la terapia molecular dirigida específica del cáncer, que puede beneficiar a pacientes cuyos cánceres dependen de una señalización descontrolada del EGFR debido a una sobreexpresión o a mutaciones con ganancia de función, incluyendo las mutaciones en el dominio de la cinasa del *EGFRvIII* o del EGFR.

## Métodos

### 45 Grupos de ratones.

**[0091]** La generación de los ratones *Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA*, *Ink4A/Arf-/-* y de los ratones *Tet-op-EGFR L858R-IRES-Luciferase/CCSP-rtTA* se ha descrito previamente (12, 21). Todos los ratones se alojaron en un entorno exento de patógenos en el Harvard School of Public Health y todos los experimentos que se realizaron con los ratones fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Se usaron los compañeros de camada como controles en todos los experimentos. Para inducir la expresión del *EGFRvIII* y del *EGFR L858R*, los ratones fueron alimentados con una dieta con doxiciclina (Research Diets, Inc.). El experimento de suspensión de la doxiciclina en estudios previos identificó claramente que los tumores de pulmón de ambos alelos eran dependientes únicamente de la doxiciclina.

55

**Terapias dirigidas mediante el uso del mAB806 o del ch806 o de cetuximab *in vivo*.**

**[0092]** Se obtuvieron imágenes de RMN de los ratones con dietas continuas de doxiciclina durante más de 8 semanas para documentar la carga tumoral en los pulmones. El mAB806 o el ch806 (generados por el Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia) fueron administrados a los ratones portadores de tumores en el pulmón a través de una inyección I.P. a unas dosis diarias de 0,5 mg. Después de un tratamiento de 1 semana, los 5 anticuerpos se administraron cada dos días a la misma dosis durante las semanas adicionales indicadas. El cetuximab (obtenido comercialmente en BMS pharmaceuticals) se administró a los ratones a través de una inyección I. P. a 1 mg por dosis mediante el uso del mismo programa de dosificación. Se obtuvieron las imágenes de RMN de los ratones en los puntos temporales indicados para determinar la reducción en el volumen del tumor, y después se sacrificaron para estudios histológicos y bioquímicos adicionales una vez completado el tratamiento. Todos los 10 ratones se mantuvieron con la dieta de doxiciclina a lo largo de los experimentos. Los compañeros de camada se usaron como controles en todos los estudios de tratamiento farmacológico.

#### Evaluación patológica de los tumores de pulmón.

**[0093]** Los ratones fueron sacrificados en los momentos indicados y se extrajeron los pulmones izquierdos y 15 se ultracongelaron para un análisis bioquímico. Después, sus pulmones derechos fueron inflados bajo presión (25 cm) con formalina neutra tamponada al 10 % durante 10 minutos y se fijaron durante una noche. Se llevaron a cabo tinciones con hematoxilina y eosina (H&E) en secciones de 5  $\mu$ m de espesor a partir de las muestras tumorales incluidas en parafina y fijadas con formalina en el Department of Pathology del Brigham and Women's Hospital.

20 **[0094]** Se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de las secciones en parafina fijadas con formalina. Los portaobjetos se desparafinizaron con xileno y se rehidrataron secuencialmente con etanol. Para los anticuerpos que requieren una recuperación del antígeno, se usó una solución de desenmascaramiento del antígeno (Vector Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Los portaobjetos fueron inactivados con peróxido de hidrógeno (al 0,3 % - 3 %) para bloquear la actividad de peroxidasa endógena, y después se lavaron con tampón de 25 automatización (Fisher Scientific). Los portaobjetos se bloquearon con suero normal al 5 % durante 1 h a la temperatura ambiente, y después se incubaron durante una noche a 4 °C con anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. Se usó un procedimiento con un complejo de peroxidasa de avidina y biotina (Vector), y los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina. Los portaobjetos se deshidrataron secuencialmente con etanol, se aclaron con xileno y se montaron en Permount (Fisher). Se usó lectina DBA biotinilada (Vector) a 1:100. Los anticuerpos usados 30 eran EGFR total y fosfo-EGFR Y1068 (1:50, Cell Signaling Technology). La apoptosis se midió mediante el recuento de las células positivas mediante el uso del ensayo TUNEL (ApoptoTag kit; Intergen, Inc.).

#### Análisis por inmunotransferencia Western.

**[0095]** Las muestras de tejido pulmonar ultracongeladas se homogeneizaron en tampón RIPA (Boston 35 Bioproducts) que contiene el Complete Protease Inhibitors Cocktail y el Phosphatase Inhibitors Cocktail Set I and II (EMD Biosciences). Los lisados de pulmón se aclaron mediante una centrifugación y se hirvieron en 1x de tampón de muestra final de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Tris 50 mM (a pH 6,8), 10 % de glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,715 M, 2 % de SDS y 0,01 % de azul de bromofenol) durante 5 minutos. Después, los lisados se separaron mediante 40 una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron mediante una inmunotransferencia con los anticuerpos mediante el uso del sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology). Los anticuerpos usados en este estudio están dirigidos contra el EGFR total, el fosfo-EGFR (pY1068), el Akt total, el fosfo-AKT (pS473), el Erk1/2 total y el fosfo-ERK 1/2 (pT202/pY204) (todos de Cell Signaling); y la actina  $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los anticuerpos se usaron 45 según las condiciones recomendadas por el fabricante.

#### 45 RMN y medición del volumen del tumor

**[0096]** Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 1,5-2 % (IsoFlo®, Abbot Laboratories) mezclado con un 100 % de oxígeno a través de una mascarilla facial. Con objeto de eliminar problemas por el movimiento, se 50 aplicó una sincronización tanto cardíaca como respiratoria a todos los estudios de RMN. Dado que la adquisición de la señal de RM esta sincronizada con los ciclos cardíacos y respiratorios, la señal de RM se adquirió en cada fase cardíaca y al final de cada fase de espiración, permitiendo reducir significativamente los artefactos por movimiento.

**[0097]** Los protocolos de RMN optimizados para la evaluación del parénquima y de los vasos pulmonares en 55 los ratones normales (29) fueron adaptados para una operación a 4,7 Teslas (Biospec 47/40, Bruker BioSpin, Karlsruhe, Alemania). El sistema está equipado con sistemas en gradiente apantallados con un gradiente de potencia máximo de 30 G/cm, y un sistema de activación por el ciclo cardiaco-respiratorio (BioTrig, Bruker BioSpin,

Karlsruhe, Alemania). Después los animales se colocaron boca abajo con los electrodos (en ambas almohadillas delanteras y en la almohadilla trasera izquierda) para la activación cardíaca, y un sensor respiratorio en sus cuerpos, primero la cabeza en el sistema, con el tórax centrado con respecto al centro de la bobina de la jaula de radiofrecuencia (diámetro interno de 3 cm). Con el fin de un posicionamiento reproducible de la región de las 5 imágenes, en primer lugar se adquirió una imagen multicorte a baja resolución, que sirve como localizador del final de la fase respiratoria, para la totalidad del pulmón, en los planos tanto transversal como coronal mediante el uso de una secuencia de eco de espín rápida (RARE: adquisición rápida con mejora en la relajación, TR/TE efectiva = 1000/28 ms, ancho de banda = 50 kHz, campo de visión = 30 mm, matriz = 128 x 128, espesor del corte = 1 mm, número de excitaciones = 1). Además, se obtuvieron imágenes bidimensionales (2D) en eco de gradiente multicorte 10 en multicortes de los planos transversal y coronal que engloban la totalidad del pulmón con activación cardiaco-respiratoria. Se seleccionó un tiempo de repetición del pulso (TR) menor que la duración de un ciclo cardíaco (que varía entre 150 y 200 ms, promedio de 178 ms), en el que se completaba una línea de espacio k por cada imagen 15 por cada latido cardíaco. Se usó el tiempo de eco mínimo (TE: 1,8 ms) para reducir el efecto de susceptibilidad que surge de la interfase entre el aire/hueso y el tejido, que de otro modo reduciría la señal de la RM. Otros parámetros 20 del escáner eran: ángulo de giro = 22º, tamaño de la matriz = 256 x 256, campo de visión (FOV) = 2,56 cm<sup>2</sup>, espesor de corte = 1 mm, y número de excitación (NEX) = 4, proporcionando una resolución en plano de 100 µm<sup>2</sup>. El tiempo de escáner total fue de aproximadamente 6-7 minutos en cada plano, dependiendo de las tasas cardíacas/respiratorias individuales del animal. En cada imagen de la RM, las áreas que indican el tumor en el pulmón fueron segmentadas y medidas manualmente para calcular los volúmenes tumorales mediante el uso de 20 ImageJ (ver. 1.33, National Institute of Health).

## REFERENCIAS

## [0098]

- 25 1. Ji, H., Sharpless, N. E. y Wong, K. K. 2006. EGFR Target Therapy: View From Biological Standpoint. *Cell Cycle*. 5 (18): 2072-2076. Publicación electrónica 2006 Sep15.
2. Hynes, N. E. y Lane, H. A. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*. 5: 341-354.
3. Arteaga, C. L. 2003. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp. Cell. Res.* 284: 122-130.
4. Mendelsohn, J. y Baselga, J. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 19: 6550-6565.
5. Snyder, L. C., Astsaturov, I. y Weiner, L. M. 2005. Overview of monoclonal antibodies and small molecules targeting the epidermal growth factor receptor pathway in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer*. 5 Supl. 2: S71-80.
6. Herbst, R. S. 2002. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park)*. 16: 19-24.
7. Groner, B., Hartmann, C. y Wels, W. 2004. Therapeutic antibodies. *Curr. Mol. Med.* 4: 539-547
8. Haber, D. A., et al. 2005. Molecular targeted therapy of lung cancer: EGFR mutations and response to EGFR inhibitors. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* 70: 419-426.
9. Park, K. y Goto, K. 2006. A review of the benefit-risk profile of gefitinib in Asian patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Curr. Med. Res. Opin.* 22: 561-573.
10. Sakurada, A., Shepherd, F. A. y Tsao, M.S. 2006. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: impact of primary or secondary mutations. *Clin. Lung Cancer*. 7 Supl. 4: S138-144.
11. Halatsch, M. E., Schmidt, U., Behnke-Mursch, J., Unterberg, A. y Wirtz, C. R. 2006. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat. Rev.* 32: 74-89.
12. Ji, H., et al. 2006. Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 103: 7817-7822.
13. Sok, J. C. et al. 2006. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin. Cancer. Res.* 12: 5064-5073.
- 50 14. Italiano, A. 2006. Targeting the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: advances and controversies. *Oncology*. 70: 161-167.
15. Jungbluth, A. A. et al. 2003. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 100: 639-644.
16. Luwor, R. B. et al. 2001. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res.* 61: 5355-5361.
17. Mishima, K. et al. 2001. Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant

- epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. *Cancer Res.* 61: 5349-5354.
18. Johns, T. G. et al. 2004. Identification of the epitope for the epidermal growth factor receptor-specific monoclonal antibody 806 reveals that it preferentially recognizes an untethered form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 279: 30375-30384.
- 5 19. Johns, T. G. et al. 2002. Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *Int. J. Cancer.* 98: 398-408.
- 10 20. Shigematsu, H. y Gazdar, A. F. 2006. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer.* 118: 257-262.
21. Ji, H. et al. 2006. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and *in vivo* sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell.* 9: 485-495.
- 15 22. Panousis, C. et al. 2005. Engineering and characterisation of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR. *Br. J. Cancer.* 92: 1069-1077.
23. Politi, K. et al. 2006. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes. Dev.* 20: 1496-1510.
- 15 24. Li, S. et al. 2005. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell.* 7: 301-311.
- 25 25. Pedersen, M. W. and Poulsen, H. S. 2006. [Mutations in the epidermal growth factor receptor: structure and biological function in human tumors]. *Ugeskr. Laeger.* 168: 2354-2361.
26. Janne, P. A., Engelman, J. A. y Johnson, B. E. 2005. Epidermal growth factor receptor mutations in non-smallcell lung cancer: implications for treatment and tumor biology. *J Clin. Oncol.* 23: 3227-3234.
27. Kobayashi, S. et al. 2005. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 352: 786-792.
28. Kobayashi, S. et al. 2005. An alternative inhibitor overcomes resistance caused by a mutation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65: 7096-7101.
29. Kubo, S. et al. 2006. Three-dimensional magnetic resonance microscopy of pulmonary solitary tumors in transgenic mice. *Magn. Reson. Med.* 56: 698-703.

## 30 EJEMPLO 2

### EL ANTICUERPO 806 DA LUGAR A LA REGRESIÓN DEL TUMOR EN TUMORES DE PULMÓN CON LA MUTACIÓN T790M DEL EGFR

- 35 **[0099]** Se generaron ratones portadores de la mutación secundaria T790M del EGFR. Se administró el mAB806 a los ratones portadores de los tumores de pulmón a través de una inyección I.P. a una dosis diaria de 0,5 mg por ratón durante 4 semanas. Se obtuvieron imágenes sucesivas de RMN de los ratones tratados al final de las semanas 2 y 4 de tratamiento, como se describe a continuación.

### 40 Generación del grupo de ratones Tet-op-hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA

- [0100]** Para generar ratones con una expresión inducible del EGFR mutante humano T790M-L858R, construimos un segmento de ADN de 4,7 kb que consiste en siete repeticiones directas de la secuencia operadora de la tetraciclina (tet), seguida del ADNc del EGFR T790M-L858R y una poliA de ?-globina. El constructo se inyectó en blastocitos FVB/N y la progenie se cribó mediante el uso de una estrategia de PCR. Se identificaron quince fundadores Tet-op-hEGFR T790M-L858R y después se cruzaron con ratones CCSP-rtTA (un alelo del que se ha demostrado que se dirige específicamente a la expresión de la proteína activadora en trans de la tetraciclina inversa (rtTA) en células epiteliales alveolares de tipo II (Fisher GH et al (2001) *Genes Dev* 15 (24): 3249-62), para generar grupos de ratones bitransgénicos inducibles portadores de ambos transgenes, tanto el activador como el respondedor (Fisher GH et al (2001) *Genes Dev* 15 (24): 3249-62; Perl AK, Tichelaar JW y Whitsett JA. (2002) *Transgenic Res* 11 (1): 21-9). Se identificaron cuatro fundadores hEGFR T790M-L858R fuertemente regulados (#17, #19, #24 y #29) a través de un análisis mediante una RT-PCR, y se determinó el número de copias de los fundadores individuales mediante una PCR cuantitativa en tiempo real (Ji H et al (2006) *Cancer Cell* 9 (6): 485-95).

### Expresión fuertemente regulada del EGFR T790M-L858R en el tejido pulmonar a nivel del ARN

- 55 **[0101]** Se evaluó la inducibilidad de la expresión del transgen mutante del EGFR en el compartimento pulmonar a nivel del ARN mediante una RT-PCR con cebadores específicos para el EGFR humano. Se recogieron los pulmones de los grupos de ratones bitransgénicos Tet-op-hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA para cada potencial

fundador antes y después de 8 semanas de administración de doxiciclina, y después de 3 días de la retirada de la doxiciclina después de una administración de doxiciclina durante un periodo de 8 semanas. El transcripto del EGFR mutante era indetectable tanto en los ratones NOD transgénicos como en los ratones bitransgénicos sin el tratamiento con doxiciclina, mientras que se hizo fácilmente detectable después de una administración de doxiciclina 5 durante 8 semanas; la transcripción del EGFR mutante fue completamente anulada a los 3 días de la suspensión del tratamiento con doxiciclina en todas las líneas. Para confirmar adicionalmente que los transcritos del EGFR mutante son inducibles y están fuertemente regulados por la doxiciclina, se llevó a cabo una RT-PCR mediante el uso de los mismos cebadores descritos anteriormente, y una PCR cuantitativa en tiempo real para las muestras de pulmón 10 recogidas en los puntos temporales sucesivos de administración y suspensión de doxiciclina a partir del fundador #19. Se observó la expresión del EGFR después de 1 semana de administración de doxiciclina, y se mantuvo a un nivel comparable a lo largo del periodo de administración de 8 semanas; la suspensión de la doxiciclina fue suficiente para bloquear la expresión del EGFR mutante, y no se observó expresión del transgen 12 semanas después de la suspensión de la doxiciclina.

15 La sobreexpresión del EGFR T790M-L858R mutante dirige el desarrollo de adenocarcinomas de pulmón con características bronquioloalveolares en el parénquima, y de adenocarcinoma papilar en las vías aéreas

**[0102]** Para determinar si la sobreexpresión de los hEGFR mutantes dirigen la oncogénesis pulmonar, se obtuvieron imágenes de resonancia magnética (RMN) de ratones bitransgénicos hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 20 con una administración continua de doxiciclina, y se sacrificaron en diversos puntos temporales para el análisis histológico de los pulmones. Los tumores sólo pudieron observarse mediante las imágenes de RMN después de entre 5 ~ 6 semanas de administración de doxiciclina, y el volumen del tumor, según se define mediante las imágenes de RMN, aumentó después de un tratamiento prolongado con doxiciclina. Al contrario que en los ratones sin tratar, comenzaron a desarrollarse lesiones tempranas en el parénquima de los pulmones después de 2-3 25 semanas de tratamiento con doxiciclina. Después de 4-5 semanas, apareció el típico BAC.

**[0103]** Apareció un adenocarcinoma invasivo con características bronquioloalveolares después de 7-9 semanas, y se volvió el patrón histológico dominante después de 12 semanas de tratamiento con doxiciclina. Los adenocarcinomas de parénquima de pulmón observados en nuestro modelo de ratón son histológicamente similares 30 a los del modelo de ratón EGFR L858R descrito previamente (Ji, H., et al. (2006) Cancer Cell 9: 485-495; Politi, K., et al. (2006) Genes Dev. 20: 1496-1510), y también son similares a los observados en un subconjunto de pacientes con NSCLC que originalmente respondieron al erlotinib.

**[0104]** Además de los adenocarcinomas de parénquima, los ratones hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 35 también desarrollaron adenocarcinomas papilares bronquiales. Se observó una neoplasia papilar temprana en los bronquiolos después de 2-3 semanas de administración continua de doxiciclina, y después se desarrolló en un adenocarcinoma en las entre 6 y 8 semanas adicionales. Los cuatro fundadores mostraban unas características morfológicas similares y una latencia en la oncogénesis similar. Se encontraron tumores bronquiales en los 4 ratones fundadores hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA identificados en el estudio actual, pero estaban ausentes en los 40 cuatro ratones EGFR L858R. Ocasionalmente pudieron observarse focos metastásicos del adenocarcinoma en los nódulos linfáticos de los ratones que desarrollan tumores de pulmón dirigidos por el EGFR T790M-L858R, pero no en los ratones con los tumores dirigidos por el EGFR L858R. La tinción de IHC de ambos tumores bronquiales y parenquimatosos con marcadores celulares específicos muestran diferentes patrones de diferenciación. La proteína 45 protensioactiva C (SPC) es un biomarcador único para los neumocitos de tipo II de los alvéolos, mientras que la proteína secretora de las células claras (CCSP) es específica de las células claras en el epitelio bronquiolar. La mayoría de los tumores parenquimatosos mostraron una intensa tinción de la SPC, lo que implica un origen neumocítico de tipo II, como se esperaba. Por el contrario, los tumores bronquiales eran negativos para la SPC. De forma interesante, únicamente un pequeño subconjunto de células tumorales bronquiales es positivo para la CCSP. Esto podría explicarse posiblemente por el origen de las células claras, seguido de una mala diferenciación, que dio 50 lugar a la pérdida del marcador de expresión CCSP.

La expresión de los hEGFR T790M-L858R mutantes es esencial para el mantenimiento del tumor de ambos adenocarcinomas parenquimatoso y bronquial

55 **[0105]** Ambos adenocarcinomas de pulmón bronquial y parenquimatoso de los ratones hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA presentaban una tinción positiva para los anticuerpos totales y los fosfo-EGFR, lo que indica que el EGFR mutante expresado es funcionalmente activo. Después de 3 días de la retirada de la doxiciclina, no se observaron señales positivas de ninguno de los anticuerpos, lo que implica que ambos tipos de tumores están dirigidos por, y son dependientes del, EGFR T790M-L858R para su supervivencia. También observamos un

aumento en la tinción positiva en el ensayo de marcaje del extremo libre con dUTP-biotina terminal mediado por la desoxinucleotidiltransferasa (TUNEL) después de la retirada de la doxiciclina, lo que indica que se habían desencadenado procesos apoptóticos.

5 **[0106]** Coherentemente con la apoptosis sugerida por la tinción TUNEL, los resultados de las imágenes de RMN demuestran que el tumor de pulmón dirigido por el EGFR T790M- L858R desapareció completamente después de 10 días de la retirada de la doxiciclina. El análisis microscópico de los pulmones del mismo ratón que fue analizado mediante RMN muestra una histología de pulmón macroscópicamente normal. No se encontraron lesiones tumorales en las vías aéreas ni en el parénquima después de 12 semanas de la retirada de la doxiciclina en otros 10 ratones portadores de tumores.

15 **[0107]** Para cuantificar mejor la expresión del EGFR mutante en los tumores a nivel proteico, llevamos a cabo una inmunotransferencia western mediante el uso de lisados de pulmón totales de ratones bitransgénicos después de diferentes momentos de administración de doxiciclina. Aunque existen algunas diferencias individuales, la fosforilación del EGFR estaba fuertemente regulada por la doxiciclina y estaba sincronizada con la presencia de los tumores, confirmando el papel esencial de la señalización del EGFR mutante en el mantenimiento del tumor, según se observa en la tinción IHC y en las imágenes de RMN. Por lo tanto, el EGFR sigue siendo un atractivo objetivo terapéutico para nuestro nuevo modelo de ratón de cáncer de pulmón.

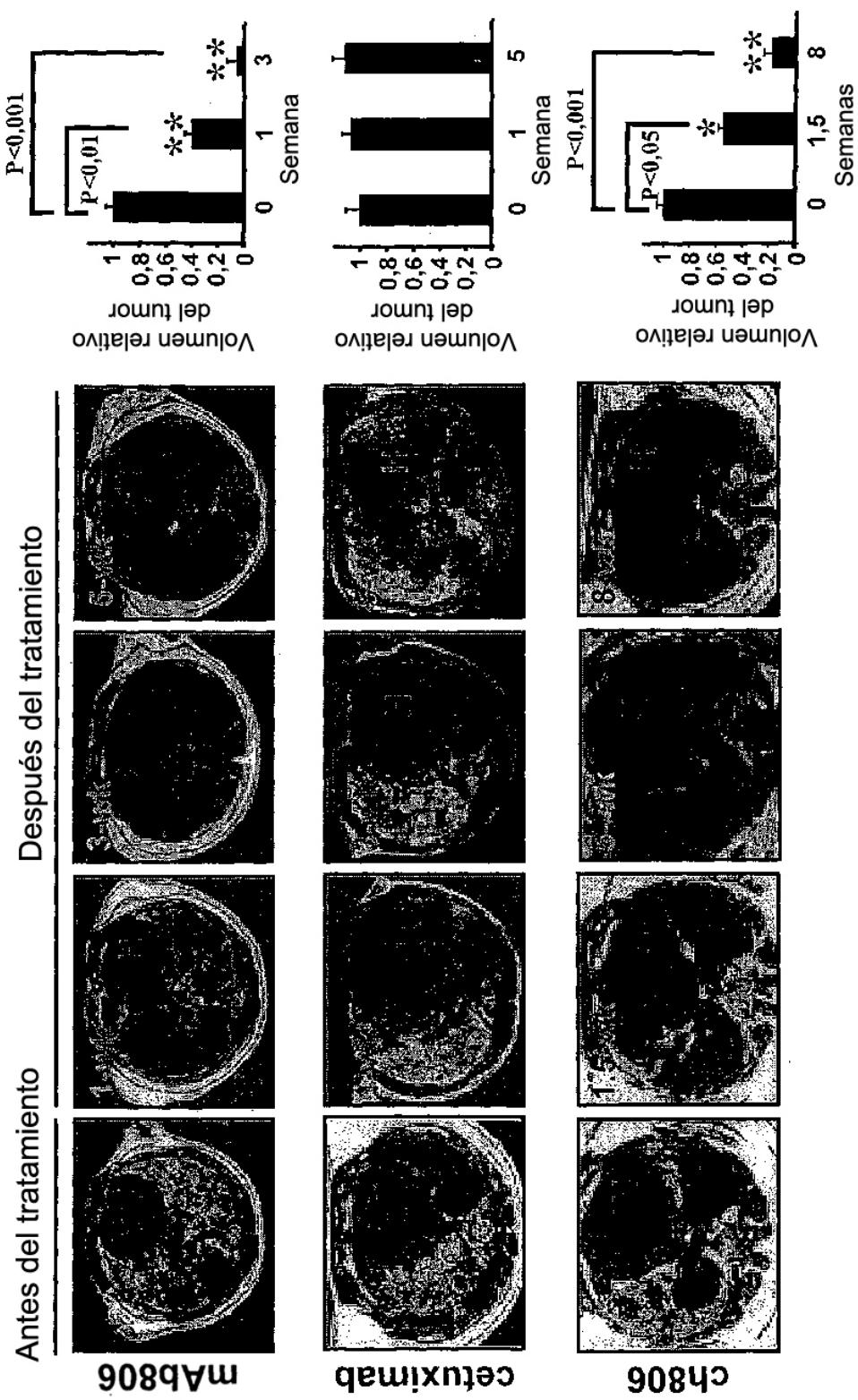
20 Tratamiento de los tumores de pulmón dirigidos por el EGFR T790M-L858R con el mAB806

25 **[0108]** Los resultados del tratamiento de los tumores de pulmón EGFR T790M-L858R con el mAB806 frente a cetuximab están representados en la FIGURA 5. Se obtuvieron imágenes por RMN de los ratones con una dieta continua de doxiciclina durante más de 8 semanas para documentar la carga tumoral. El mAB806 se administró a los 30 ratones portadores de los tumores de pulmón a través de una inyección I.P. diaria a unas dosis de 0,5 mg durante 4 semanas. El cetuximab se administró a los ratones mediante una inyección I.P. a 1 mg por dosis al día durante 4 semanas. Se obtuvieron imágenes de RMN de los ratones en las semanas 0, 2, y 4 o 5 para determinar la reducción en el volumen del tumor. El volumen del tumor se redujo a las 2 semanas (más de un 20 %), y más significativamente a las 4 semanas (más de un 30 %), mediante el tratamiento con el mAB806 . Aunque el volumen 35 del tumor se redujo inicialmente a las 2 semanas mediante el tratamiento con cetuximab, el volumen del tumor creció significativamente a las 5 semanas del tratamiento con cetuximab (el volumen del tumor observado a las 5 semanas del tratamiento con cetuximab era mayor que el volumen original a las 0 semanas). Después de completarse el tratamiento y la obtención de las imágenes por RMN, los ratones fueron sacrificados para estudios histológicos y bioquímicos adicionales. Se usaron los compañeros de camada como controles para todos los estudios del tratamiento (sin tratamiento).

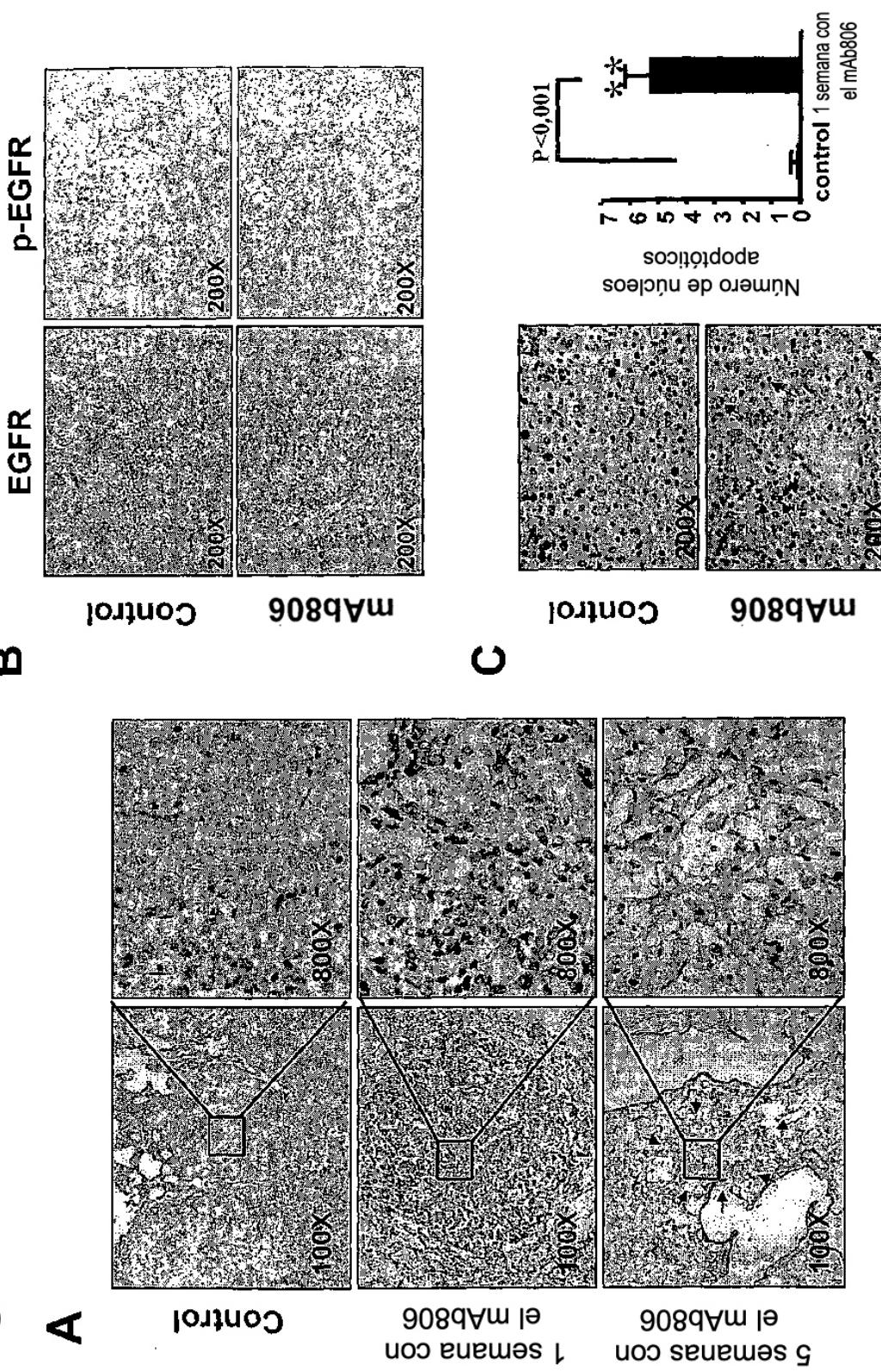
## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo mAB806 anti-EGFR o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de un cáncer mediado por el EGFR resistente a un inhibidor de la cinasa de tirosina en un mamífero, en 5 el que dicho cáncer resistente mediado por el EGFR comprende una mutación secundaria T790M en el EGFR.
2. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho mamífero ha sido tratado previamente con uno o más inhibidores de la cinasa de tirosina.
- 10 3. El anticuerpo o el fragmento para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mAB806 es un anticuerpo recombinante o un anticuerpo humanizado.
4. El anticuerpo o el fragmento para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mAB806 está marcado con un marcaje detectable o funcional.
- 15 5. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 4, en el que el marcaje funcional es un fármaco citotóxico.
6. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 4, en el que el marcaje detectable es 20 un radiomarcaje.
7. El anticuerpo o el fragmento para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en el que el cáncer mediado por el EGFR se selecciona entre glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer 25 de mama, cáncer de riñón, cáncer de retina, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer genitourinario y cáncer de vejiga.
8. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 7 en el que el cáncer es adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón epidermoide o cáncer de pulmón no microcítico.
- 30 9. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 2 en el que el inhibidor de la cinasa de tirosina es un inhibidor reversible de la cinasa de tirosina.
10. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 9 en el que el inhibidor reversible de 35 la cinasa de tirosina es una aniliniquinazolina y se selecciona entre gefitinib, erlotinib, AG1478, ST1571 y SU-6668.
11. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 2 en el que el inhibidor de la cinasa de tirosina es un inhibidor irreversible de la cinasa de tirosina.
- 40 12. El anticuerpo o el fragmento para su uso según la reivindicación 11 en el que el inhibidor irreversible de la cinasa de tirosina se selecciona entre EKB-569, EKI-569, HKI-272, HKI-357 y BffW 2992.

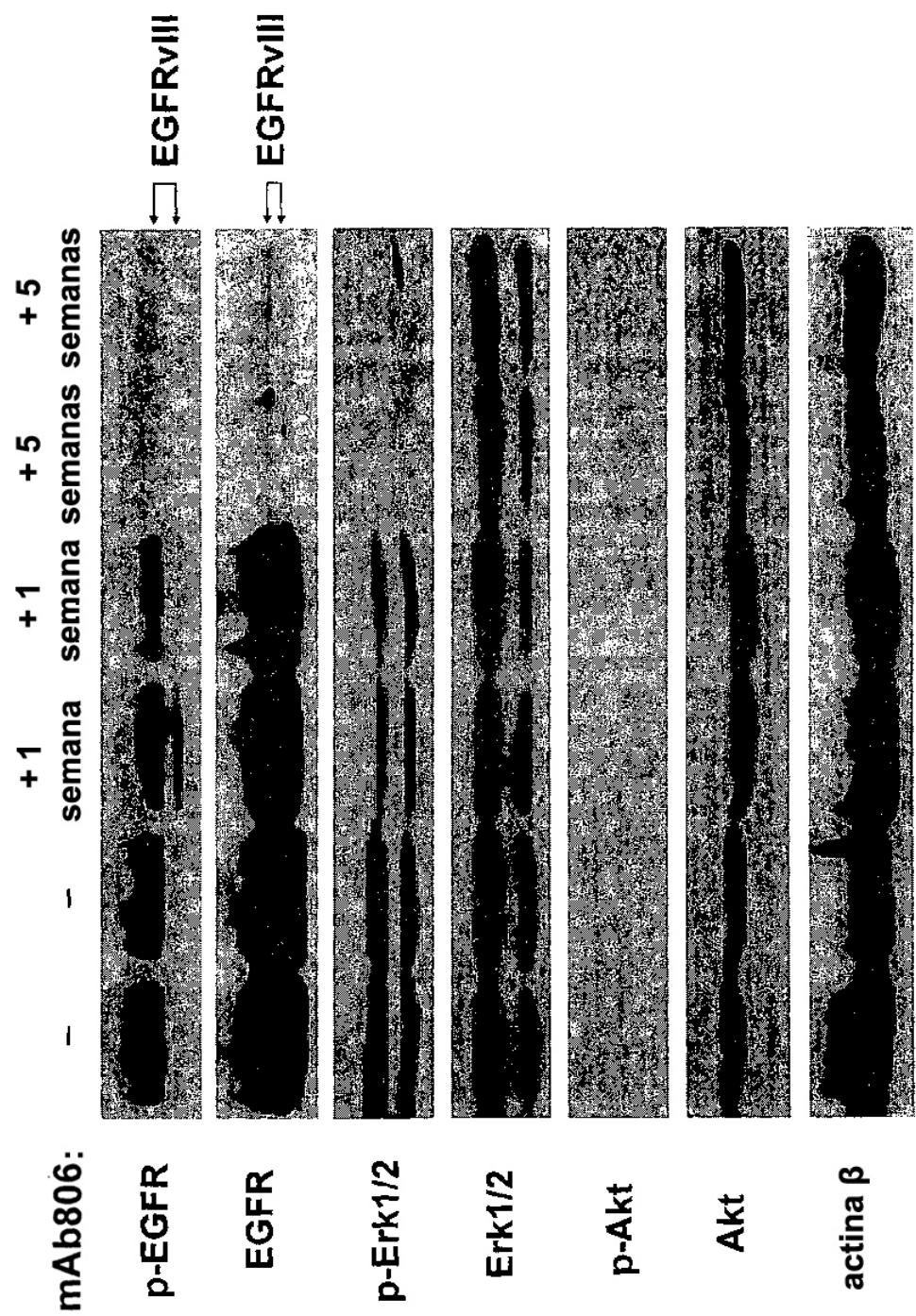
Figura 1

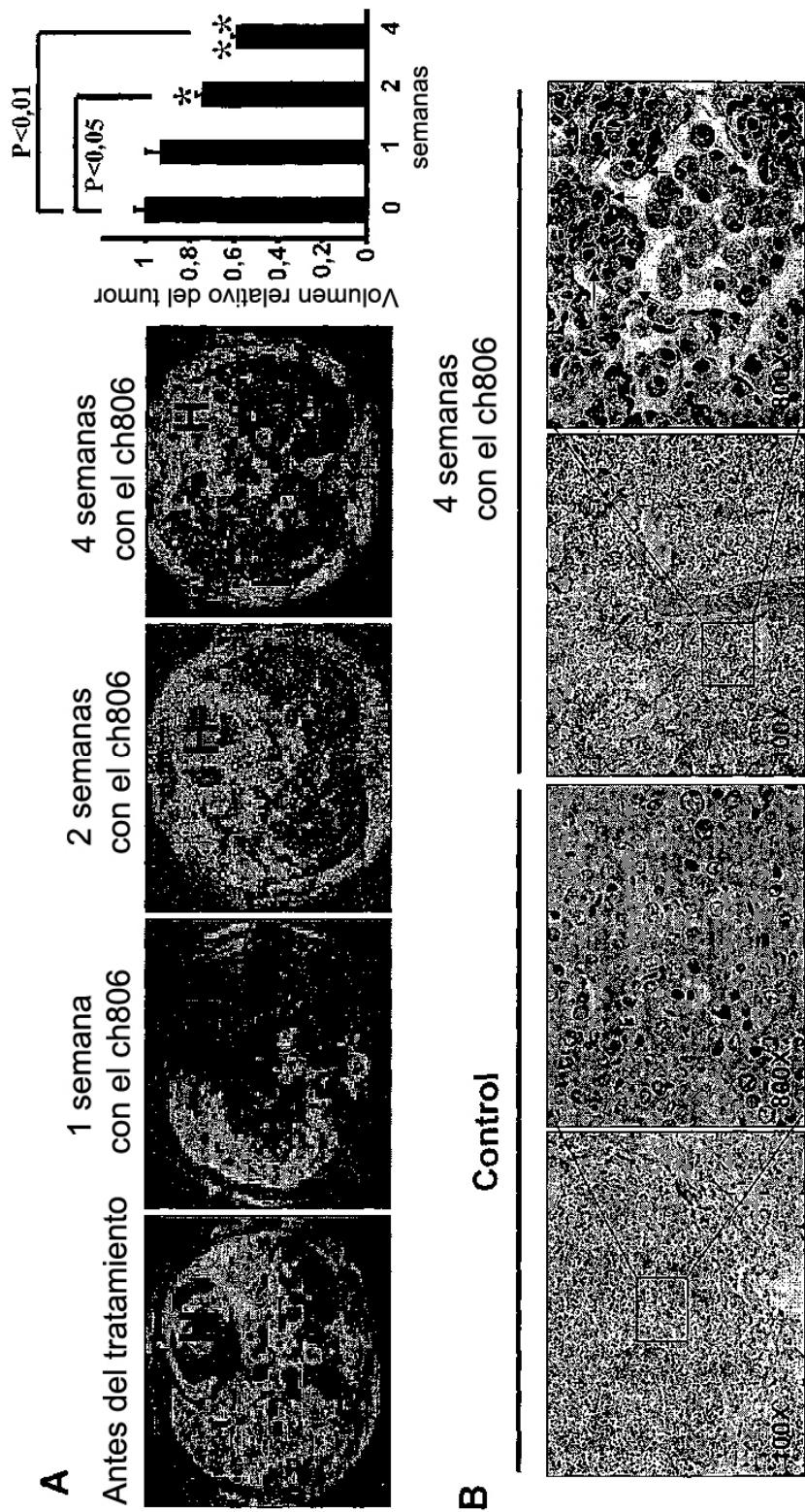


**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**

**Figura 5**

