



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 30811 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 39/395; A61K 38/21**
- (43) Date de publication : **01.10.2009**

-
- (21) N° Dépôt : **31815**
- (22) Date de Dépôt : **23.04.2009**
- (30) Données de Priorité : **29.09.2006 CU 190-2006**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/CU2007/000017 27.09.2007**
- (71) Demandeur(s) : **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR, Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa., Ciudad de La Habana, C.D. 160. Ciudad De La Habana 12100 (CU)**
- (72) Inventeur(s) : **FERNÁNDEZ MOLINA, Luis Enrique ; GARRIDO HIDALGO, Greta ; PÉREZ RODRÍGUEZ, Rolando ; SÁNCHEZ RAMÍREZ, Belinda ; FERNÁNDEZ GÓMEZ, Audry ; LÓPEZ REQUENA, Alejandro ; BEAUSOLEIL DELGADO, Irene**
- (74) Mandataire : **ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)**

-
- (54) Titre : **COMPOSITIONS THERAPEUTIQUES PERMETTANT D'AUGMENTER L'EFFET D'UNE THERAPIE AUX ANTICORPS CONTRE LE RECEPTEUR DU FACTEUR DE CROISSANCE EPIDERMIQUE**
- (57) Abrégé : **CETTE INVENTION CONCERNE DES COMPOSITIONS THÉRAPEUTIQUES SPÉCIFIQUES AUGMENTANT L'EFFICACITÉ DE LA THÉRAPIE AUX ANTICORPS MONOCLONAUX (ACMS) CONTRE LE RÉCEPTEUR DU FACTEUR DE CROISSANCE ÉPIDERMIQUE (EGFR, DE L'ANGLAIS 'EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR') ET DES INTERFÉRONS (INFS) DE TYPE I (A/B).**

Compositions thérapeutiques pour améliorer l'effet de la thérapie par les anticorps contre le récepteur du facteur de croissance épidermique.

Résumé de l'invention:

- 5 La présente invention décrit les compositions thérapeutiques spécifiques, qui augmente l'efficacité du traitement thérapeutique en utilisant les anticorps monoclonaux contre le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR) est une combinaison avec les IFN de type I.

Compositions thérapeutiques permettant d'augmenter l'effet d'une thérapie aux anticorps contre le récepteur du facteur de croissance épidermique.

Champ de l'invention

- 5 La présente invention porte sur le champ biotechnologique, en particulier avec l'immunothérapie de cancer spécifique. La présente invention est basée sur l'effet synergique dans la croissance de la métastase de la combinaison des anticorps monoclonaux contre le récepteur de facteur de croissance anti-épidermique (anti-EGFR Mabs) et des interférons de type I (IFNs). Ainsi, la présente invention concerne
- 10 un outil thérapeutique qui surmonte les limitations des monothérapies anti-EGFR.

Art antérieur

Les anticorps monoclonaux Anti-EGFR

- 15 Le EGFR et ses ligands sont exprimés dans les tissus normaux avec l'exception de cellules hématopoïétiques (*Carpenter G. Annu Rev Biochem 1987; 56:881-914*). L'expression en excès de ces protéines a été décelée dans nombreuses tumeurs épithéliales humaines (*Salomon DS et al. Crit Rev Oncol Hematol 1995; 19:183-232*). Les études pré-cliniques ont démontré que les boucles autocrines et paracrines de EGFR-ligands régulent la prolifération et la capacité métastatique de cellules tumorales
- 20 (*Verbeek BS et al. FEBS Lett 1998; 425:145-50; O-Charoenrat P et al. Int J Cancer 2000; 86:307-17; Radinsky R et al. Clin 20 Cancer Res 1995; 1:19-31*). Comme résultat, les antagonistes EGFR puissants et sélectifs sont courants dans les essais cliniques (*Pal SK, Pegram M. Anticancer Drugs 2005; 16:483-94*).

- 25 De nos jours, la thérapie la plus réussie dans le développement clinique est le Mab IMC-C225/Cetuximab chimérique. Cetuximab lie au sous-domaine III du domaine extracellulaire du récepteur, concurrence avec le ligand et bloque l'activation de récepteur en affectant la dimérisation de récepteur. Aussi, Cetuximab induit l'internalisation et la dégradation de EGFR (*Shiqing L et al. Cancer Cell 2005; 7:301-11*). En plus, Naramura et co-travailleurs ont démontré que Cetuximab peut induire la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) à travers l'activation des cellules mononucléaires du sang périphérique du patient, suggérant que ce mécanisme puisse contribuer à l'activité anti-tumorale de ce anti-EGFR Mab (*Naramura M et al. Cancer Immunol Immunother 1993; 37:343-9*). Les études pré-cliniques utilisant Cetuximab,
- 30 ont rendu des régressions complètes des tumeurs de xénogreffes humaines sur l'expression de EGFR (*Goldstein J et al. J Immunol 1997; 158:872-9*).

Essais cliniques de la Phase I dans les patients avec des tumeurs solides exprimant EGFR avancé ont démontré que Cetuximab est bien toléré (*Robert F et al. J Clin Oncol 2001; 19:3234-43; Baselga J et al. J Clin Oncol 2000; 18:904-14; Shin DM et al. Clin Cancer Res 2001; 7:1204-13*). Les événements adverses les plus relevant cliniquement attribuables à Cetuximab sont des réactions allergiques et de la toxicité de la peau (*Shin DM et al. Clin Cancer Res 2001; 7:1204-13*). Cetuximab a été approuvé récemment par US Food and Drug Administration (FDA), soit en monothérapie ou en combinaison avec irinotecan, pour le traitement des patients à cancer rectal du côlon avancé avec une expression EGFR décelable (*ImClone Systems, Erbitux (Cetuximab). US Prescribing Information. ImClone System, 2004*). En plus, les tests extensifs de la phase II et clinique III de Cetuximab sont continués dans les patients de carcinome pancréatiques (*Xiong HQ et al. J Clin Oncol 2004; 22:2610-6*), les patients de cancer pulmonaire à non petites cellules (NSCLC) (*Lynch TJ et al. Proc Am Soc Clin Oncol 2004; Rosell R et al. Proc. Am. Soc Clin. Oncol. 2004*) et les patients à carcinome de cellules squameuses de la tête et du cou (SCCHN) (*Bonner JA et al. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2004*).

Également, l'anticorps humanisé h-R3/TheraCIM (Center of Molecular Immunology) a été évalué. Ce Mab possède une capacité similaire à l'anticorps murin original pour inhiber la liaison de EGFR/EGF (*Mateo C et al. Immunotechnology 1997; 3:71-81*). La capacité de h-R3 à inhiber la prolifération de lignée de cellules A431 dans une monocouche est similaire à Cetuximab. Dans des études précliniques en utilisant h-R3, a obtenu des régressions complètes des xénogreffes de tumeur humaine exprimant en excès EGFR (*Viloria-Petit A et al. Cancer Res 2001; 61:5090-101*). h-R3 est enregistré dans Cuba by Center for Drug Quality Control (CECMED) pour le traitement des patients à cancer avancé de la tête et du cou (*Crombet T et al. J Clin Oncol 2004; 22:1646-54*). Également, les tests des essais cliniques de h-R3 ont continué dans d'autres localisations tel que: le cerveau, le sein, la prostate et de poumon (*Crombet T, personal communication*).

D'autres anti-EGFR Mabs qui possèdent un mécanisme similaire d'action sont généralement sous une recherche clinique. ABX-EGF est un IgG2 anti-EGFR Mab totalement humain qui inhibe l'activation du récepteur dépendant de ligand et inhibe la croissance des xénogreffes de tumeur humaine (*Yang X et al. Cancer Res 1999; 59:1236-43*). Récemment, des résultats positifs de test de clinique de la phase III de ABX-EGF dans les patients à cancer rectal du côlon ont été rapportés (*Tyagi P. Clin Colorectal Cancer 2005; 5:21-3*). De plus, les essais cliniques de la phase II avec ce Mab dans le cancer rénal et les patients NSCLC sont en cours (*Tiseo M et al. Curr Med Chem Anticancer Agents 2004; 4:139-48*). EMD 72000 (anti-EGFR Mab humanisé) a été évalué dans des patients de cancer pancréatique (*Graeven U et al. Br J Cancer 2006; 94:1293-9*). Cependant, le patient de cancer métastatique traité par l'anti-EGFR Mabs n'ont pas atteint les bienfaits de survie importantes. Par exemple, les patients à cancer rectal de colon irinotecan-refractaire traité par Cetuximab possède

une stabilisation à la maladie mais ils n'atteignent pas une augmentation de la survie (Cunningham D et al. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 337-345). Ces résultats mènent à la recherche des combinaisons thérapeutiques qui permettent l'augmentation de l'efficacité anti-EGFR Mab.

5 Induction de lymphocytes T cytotoxiques par une thérapie passive à base de Mab

L'amorçage croisé est décrit d'abord par Michael Bevan il y a plus de 25 ans (Bevan MJ. *J Exp Med* 1976; 143: 1283-88). Ce phénomène est basé dans la capacité des cellules présentant l'antigène (APC) pour amorcer les réactions des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) contre les antigènes d'histocompatibilité mineurs capturés des cellules donatrices étrangers. Un nombre de facteurs a été identifié de lancer et améliorer la livraison d'un antigène à la voie de présentation de la classe I MHC des cellules dendritiques (DC). Parmi celles-ci sont les protéines à choc thermique (Suto R, Srivastava PK. *Science* 1995; 269: 1585-88), les exosomes (Wolfers J et al. *Nature Medicine* 2001; 7: 297-303), et les complexes immunes (Regnault A et al. *J Exp Med* 25 1999; 189: 371-80). Les cellules agonisantes, apoptotiques ou nécrotiques, sont une source spécialement attractive d'un antigène pour la présentation croisée. Les conséquences immunologiques de l'ingestion de la matière cellulaire apoptotique/nécrotique par DC sont controversées (Russo V et al. *PNAS* 2000; 97: 2185-90; Yrild BU et al. *J Exp Med* 2000; 191: 613-21). En general, le matériel cellulaire nécrotique est considéré d'être immunogénique, alors que l'apoptose est pensée d'être inoffensive immunologiquement ou même tolérant. Cependant, dans certains systèmes de modèle, la mort cellulaire apoptotique a été montrée d'être une source antigénique immunogénique attractive pour l'amorçage croisé de CTL en raison de sa libération de "signaux dangereux " pour la maturation de APC (Lake RA, Robinson BWS. *Nature Reviews* 2005; 5: 397-405).

C2B8 (Rituximab) est un MAb de souris humain chimérique contre CD20 (Relf Meet et al. *Blood* 1994; 83: 435-45). Cet agent es utilisé dans le traitement des lymphomes non-Hodgkin de type de cellules B où il lancer une suppression rapide et efficace de cellules B normales et néoplastiques avec un taux de réaction d'environ 50% et des intervalles sans progression de la maladie jusqu'à 12 mois (Maloney DG. *Curr Opin Haematol* 1998; 5:237-43; Coiffier B et al. *Blood* 1998; 92:1927-32; Hainsworth JD et al. *Blood* 2000; 95:3052-56). Plusieurs études ont indiqué que les réactions cliniques et moléculaire maximales à la thérapie par Rituximab peuvent prendre plusieurs mois, suggérant que les mécanismes cytolytiques à courts termes telle que l'apoptose, la cytotoxicité dépendante de complément (CDC), et ADCC sont non seulement celles impliquées. La lyse activé par Rituximab des cellules de lymphome à travers l'un quelconque des derniers mécanismes peut lancer la prise et la présentation croisée des peptides dérivés par les cellules de lymphome par DC, induisant leur maturation et permettant la génération de CTL spécifique (Selenko N et al. *J. Clin. Oncol* 2002;

3:124-130). L'effet de vaccin induit par Rituximab n'a pas été strictement étudié. Les essais cliniques aléatoires sont requis pour confirmer l'impact clinique de cette approche.

Interférons de type I Alpha/ bêta comme thérapie anti-tumorale

5 Les IFN (IFNs- α/β) de type I alpha/bêta sont des agents biologiques utilisés pour la
thérapie anti-cancéreuse, spécialement chez les personnes à mélanome et carcinome
rénal (*Agarwala SS, Kirkwood JM. Semin. Surg. Oncol. 1998; 14: 302-310; Vlock DR et*
al. J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 1996; 19:433-442; Kirkwood JM et al.
Semin. Oncol. 1997; 24: 16-23; Kirkwood JM et al. J Clin. Oncol 1996; 14: 7-17). IFN-
10 α est la première cytokine produite par la technologie d'ADN recombinante, il a été
démonstré de réguler la prolifération et la différenciation tumorale (*Hertzog et al. J Biol*
Chem 1994; 269:14088-93). Egalement, il a été rapporté son effet dans l'induction
d'apoptose (*Clemens MJ. J Interferon Cytokine Res 2003; 23:277-92*) et de l'inhibition
15 d'angiogénèse (*Sidky YA et al. Cancer Res 1987; 47:5155- 61*). En plus à l'effet IFNs-
 α/β sur les cellules tumorales, IFNs- α/β exprime plusieurs effets dans les cellules
immunitaires hôtes, qui peuvent jouer un rôle important dans la réaction immunitaire
anti-tumorale (*Belardelli F. APMIS. 1995; 103:161-179*). Cependant, les données de
l'efficacité cliniques de IFN- α dans les tumeurs solides sont incompatibles. En fait,
20 seulement les patients avec des tumeurs spécifiques sont bénéficiés, alors que les
autres sont résistants partiellement ou totalement à cette thérapie.

Les études sur le rôle de INF- α dans la régulation de l'expression de EGFR sur les
cellules tumorales ont été publiées (*Budillon A et al. Cancer Res 1991; 51: 1294-9;*
Caraglia M et al. Int J Cancer 1995; 4: 309-16; Heise H et al. Anti Cancer Drugs 1995,
6:686-92; Scambia G et al. Int J Cancer 1994; 58: 769-73; Yang JL et al. Gut 2004; 53:
25 *123-129; Qu XJ et al. J Urology 2004; 172: 733-738*). Selon les rapports qui
démontrent la capacité de INF- α à augmenter l'expression et l'activité de EGFR dans
certaines tumeurs, différents auteurs ont étudié la combinaison des inhibiteurs de
tyrosine kinase de EGFR (EGFR TKIs) et INF- α en obtenant un avantage anti-tumoral
pour la thérapie combinée (*Yang JL et al. Oncology 2005; 69: 224-238; Brúcese Fet al.*
30 *Clin Cancer Res 2006; 12: 617-625; Yang JL et al. Cancer Letters 2005; 225: 61-74*).
Pourtant, ces résultats ne peuvent être pas généralisées en raison de l'effet IFN- α
dans l'expression de EGFR dans les cellules tumorales est très variable (*Scambia G et*
al. Int JCancer 1994; Yang JL et al. Gut 2004; 53: 123-129; Qu XJ et al. J Urology
2004; 172: 733-738). Ce phénomène peut limiter l'avantage de traitement par INF- α
35 pour une niche de patient. D'autre part, le IFN- α peut augmenter les molécules de la
classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC I) dans des tissus normaux
(*Cho HJet al. J Immunology 2002; 168: 4907-13; Lang KS et al. Nature Medicine 2005;*
11: 138-44). Dans cette invention, il est montré que l'application de INF- α aux cellules
tumorales peut augmenter l'expression de MHC I, même si les tumeurs diminuent les

molécules I de MHC comme des mécanismes de fuite aux effecteurs immunologiques. Par conséquent, la combinaison de IFN- α /anti-EGFR Mab peut être plus avantageuse que la combinaison par IFN- α /EGFR TKI en raison des anti-EGFR Mabs peut induire une réaction de CTL et son effet n'est pas décrite aux EGFR TKI.

- 5 La présente invention est basée sur deux événements biologiques ni décrits ni suggérés par l'art précédant. D'abord, la thérapie à base de anti-EGFR Mab est dépendante de cellules T CD8⁺. Spécifiquement, l'effet anti-métastatique des anti-EGFR Mabs est dépendante de cellules T CD8⁺. Deuxièmement, le traitement par l'IFN des cellules tumorales augmente l'expression de MHC I. l'application combinée de
10 ces faits permet en augmentant remarquablement l'effet thérapeutique anti-cancéreux de l'anti-EGFR Mabs et les IFNs de type I.

Révélation détaillée de l'invention.

- 15 La présente invention porte sur une composition thérapeutique utile pour le traitement de cancer comportant l'administration simultanée et séquentielle d'un anti-EGFR Mab et IFNs de type I (un ou plusieurs), où l'anti-EGFR Mab est un anticorps chimérique ou humanisé. Particulièrement, l'invention porte sur la composition thérapeutique comportant le h-R3Mab humanisé, qui reconnaît le EGFR, et qui est produit par la lignée cellulaire avec le numéro de dépôt ECACC 951110101). De plus, la composition
20 thérapeutique de la présente invention comporte les IFN de type I, et plus particulièrement la composition comporte IFN- α , et plus spécifiquement le IFN- α humain recombinant.

- En plus, la présente invention porte sur le programme d'administration de la composition thérapeutique décrite dans les présentes, laquelle administration peut être
25 simultanée ou séquentielle.

Dans un autre mode de réalisation, la présente invention concerne un kit pharmaceutique composé par un récipient avec le anti-EGFR Mab, au moins un récipient avec au moins un IFN et une étiquette ou d'autres instructions au dosage et l'utilisation.

- 30 En raison des raisons éthiques, il est impossible que l'expérimentation dans l'être humain ainsi la présente invention concerne davantage à un modèle expérimental pour démontrer "in vivo" la solution technique révélée par la présente invention. Ce modèle expérimental comporte un anticorps murin contre le récepteur EGF murin autant que l'effet biologique de cet anticorps sur la croissance des lignées de cellules tumorales.

- 35 ***Evaluation de l'effet anti-métastatique de traitement par anti-EGFR Mab***

Des souris Balb/c ou C57BL/6, âgées de 8 à 12 semaines, sont utilisées comme modèle expérimental pour l'évaluation de l'effet anti-métastatique de traitement par l'anti-EGFR Mab.

5 Les souris sont traitées par un Mab spécifique pour le domaine extracellulaire de EGFR murin ou Mab témoin (anticorps avec le même isotype de l'anti-EGFR Mab, qui est sans rapport à chaque tumeur) en utilisant une dose entre 1 et 25 mg/kg. Les anticorps sont inoculés par une injection intraveineuse ou intrapéritonéale. Le protocole d'administration peut être mené par différentes manières:

- 10 • Pour commencer le jour avant le déclenchement de la tumeur et pour continuer les jours 1, 2, 3 après le déclenchement de la tumeur. Après le 6ème jour, le traitement est réinitié avec ces trois doses par semaine jusqu'à la fin de l'essai.
- pour commencer le 2ème jour après déclenchement de la tumeur et une dose additionnelle le 3^{ème} jour. Après le 6ème jour de l'administration est re-initié par ces trois doses par semaine jusqu'à la fin de l'essai.
- 15 • Pour commencer le 6ème jour après le déclenchement de la tumeur par ces trois doses par semaines jusqu'à la fin de l'essai.

Les cellules tumorales murines qui expriment EGFR (des tumeurs de poumon, sien, côlon, prostate, cerveau, vessie et du cou et de la tête) sont inoculées dans les souris au jour zéro. Les quantités des cellules tumorales inoculées sont entre 1×10^3 et 1×10^6 par souris. Les cellules tumorales peuvent être administrées par injection intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire pour obtenir la métastase pulmonaire et hépatique. Les souris sont sacrifiées par une dislocation cervicale (20 à 45 jours après déclenchement de la tumeur). Les métastases de chaque organe sont comptées en utilisant un microscope stéréoscopique.

25 **Mesure de rôle de cellules T CD8⁺ dans l'effet anti-métastatique de anti-EGFR Mab**

Les souris sont inoculées par les cellules tumorales tel que décrit auparavant (jour 0). Elles reçoivent des injections intraveineuses ou intrapéritonéales d'un Mab spécifique pour la molécule CD8, qui est capable à éliminer les cellules positives CD8 (5 à 50 mg/Kg). L'administration de l'anti-CD8 Mab commence le jour -1 à 6 et continue tous les quatre jours jusqu'à la fin de l'essai. Aussi, les souris sont traitées par un anti-EGFR Mab tel que décrit auparavant. Les souris sont sacrifiées par une dislocation cervicale (20 à 45 jours après le déclenchement de la tumeur). Les métastases pour chaque organe sont comptées en utilisant un microscope stéréoscopique.

35 **Evaluation de l'effet anti-métastatique de combinaison par IFN- α /anti-EGFR Mab**

Les souris sont inoculées par les cellules tumorales et anti-EGFR Mab tel que décrit auparavant. De plus, ces souris sont traitées par IFN- α murin (5×10^5 - 5×10^6 U/Kg) par une injection intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée. Le protocole d'administration peut être mené par différentes manières: (a) anti-EGFR Mab et IFN- α simultanément, (b) pré-traitement (IFN- α) et traitement (anti-EGFR Mab) ou (c) pré-traitement (IFN- α) et traitement (anti-EGFR Mab + IFN- α). Les souris sont sacrifiées par une dislocation cervicale (20 à 45 jours après déclenchement de la tumeur). Les métastases pour chaque organe sont comptées en utilisant un microscope stéréoscopique.

10 **Composition immunothérapeutique comportant des anticorps anti humains EGF-R et α -INF.**

La composition de la présente invention comporte une immunothérapie passive par des MAbs spécifiques contre le domaine extracellulaire de EGF-R humain à la fois avec α -INF sera administrée aux patients immédiatement après diagnose et/ou traitement chirurgical. La composition de la présente invention doit induire la réaction immunitaire à base de cellules T CD8+ dans ces individus sous traitement.

La composition sur plan thérapeutique comportant l'anticorps anti EGF-R et le α -INF possède un effet synergique dans le développement de la métastase pulmonaire.

La procédure se compose d'administration aux patients portant le cancer avancé d'origine épithéliale une dose entre 100 à 400 mg d'un anti-EGFR MAb et le α -INF recombinant humain dans une dose entre 10 à 30×10^6 IU/ m^2 /jour. Les injections doivent suivre plusieurs programmes. De préférence, la composition thérapeutique de la présente invention suit l'un quelconque des programmes suivants: (a) une injection mensuelle pendant une semaine ou (b) quatre semaines consécutives tous les trois mois. Le traitement se poursuivra jusqu'à la régression partielle ou complète de la tumeur, ou jusqu'à l'arrivée de la réaction adverse qui requiert la cessation de traitement.

Exemples:

Exemple 1: Obtention d'un EGFR Mab anti-murin.

Les souris Balb/c sont immunisées par une protéine recombinante du domaine extracellulaire de EGFR murin (*Sánchez B et al. Int J Cancer 2006; 119:2190-2199*) émulsifié dans l'adjuvant de Freund. Les sérums sont traités au jour 0 et 60. Les anticorps spécifiques contre la protéine recombinante sont mesurés par le test ELISA. Les souris inoculées ont développé des niveaux élevés de IgG de sérum (1:80 000 à 1:100 000) contre la protéine recombinante. Une souris montrant le titre d'anticorps plus élevé contre la protéine recombinante est sélectionnée pour l'expérience de fusion. Un Mab spécifique pour le domaine extracellulaire de EGFR murin, 7A7 (IgG1), est obtenu (*Garrido G et al. Hybridoma and Hybridomics 2004; 23 (3): 168-175*). Ce

Mab reconnaît spécifiquement le EGFR murin présent dans les cellules tumorales par différentes techniques, tel que: buvardage de western, FACS et immunohistochimie.

5 La séquence de nucléotide et la séquence d'acide aminé déduite de la région variable à chaîne lourde de 7A7 Mab (GenBank access number: DQ437656) sont montrés dans la Figure 1. La nucléotide et les séquences d'acides aminés déduites de la région variable à chaîne légère (V_{κ}) de 7A7 Mab (numéro d'accession GenBank: DQ437657) sont montrés dans la Figure 2.

Exemple 2: L'effet 7A7 Mab anti-métastatique les la tumeur D122.

10 Les cellules D122 ($2,5 \times 10^5$) [tumeur D122 est un clone métastatique du carcinome pulmonaire de Lewis] sont injectées dans les veines caudales latérales des souris C57BL/6. 7A7 et Mab témoin (28 mg/kg dans 100 μ l PBS) ont été administrées le 6^{ème} jour après déclenchement de la tumeur et l'administration est continuée par trois doses par semaine. Trois semaines après l'injection de la tumeur, les souris sont sacrifiées, et les poumons sont enlevés. Le nombre de métastase pulmonaire D122 est compté.
15 L'administration de 7A7 Mab a réduit de façon significative le nombre de métastase pulmonaire D122 par rapport à Mab témoin (Figure 3), cette différence est statistiquement importante (test Mann-Whitney, $p < 0,0001$).

Exemple 3: Effet anti-métastatique de 7A7 sur la tumeur D122 est dépendant de cellules T CD8⁺.

20 Les cellules D122 ($2,5 \times 10^5$) sont injectées dans les veines caudales latérales de souris C57BL/6. 7A7 et Mab témoin (28 mg/kg dans 100 μ l PBS) ont été administrées le sixième jour après déclenchement de la tumeur et l'administration est continuée par trois doses par semaine. La réduction de cellules CD8⁺ par un anticorps spécifique (injection intrapéritonéale) a commencé le jour 6 après déclenchement de la tumeur et
25 a continué jusqu'à la fin de l'essai. L'efficacité des réductions est évaluée dans la rate et le poumon des souris. Trois semaines après injection à la tumeur, les souris sont sacrifiées, et les poumons sont enlevés. Le nombre de métastase pulmonaire D122 est compté.

30 Dans cette expérience, l'effet anti-métastatique 7A7 Mab sur la tumeur D122 est vérifié, étant observé une réduction importante dans le nombre de métastase pulmonaire D122 dans les souris traitées par 7A7 par rapport aux souris de témoin (test Dunn, $p < 0,01$) (Figure 4/Tableau 1). La réduction de cellules CD8⁺ a abrogé l'effet anti-métastatique de 7A7 Mab, en obtenant un nombre de métastase pulmonaire médian pour le groupe 7A7 supérieur au nombre de métastase pulmonaire médian du
35 groupe témoin (test Dunn, $p < 0,05$) (Figure 4/Tableau 1).

Médian			
7A7 Mab	Mab témoin	7A7 Mab + réduction	Mab témoin + réduction
7	44	49	44

Tableau 1. Nombre de métastase médian des groupes expérimentaux.

Exemple 4: Les niveaux MHC I sont augmentés dans les cellules D122 et MB16F10 par un traitement par IFN- α .

Les cellules D122 et MB16F10 (plaque de 0,25 x 10⁶/ 6 -puits) sont traitées par IFN- α (1000 U/ml) pendant 12 heures. Ensuite, le niveau d'expression de MHC I dans la membrane cellulaire est déterminé dans les cellules traitées et non traitées par FACS. Les cellules (2 x 10⁵) sont incubées dans PBS contenant 0,1% NaN₃ et 1% BSA (solution B) pendant 15 min à 4°C. Par la suite, les cellules sont colorées par un Mab spécifique pour la molécule H-2kb diluée dans la solution B (1:200, Pharmingen, EEUU). Après lavage, 10⁴ cellules sont acquises en utilisant un cytomètre de flux FACScan (Becton Dickison). Les données obtenues sont analysées en utilisant le logiciel WinMDI (version 2.8). Le traitement par IFN- α a provoqué une augmentation dans l'expression de MHC I dans la membrane des cellules D122 et MB16F10, ce traitement a augmenté aussi le pourcentage des cellules positives à IFN- α (Figure 5).

Exemple 5: L'effet de traitement par α -IFN dans l'expression de EGFR dans les cellules D122.

Les cellules D122 (plaque de 0,25 x 10⁶/ 6-puits) sont traitées par IFN- α (1000 U/ml) pendant 48 heures. Ensuite, le niveau d'expression de EGFR dans la membrane cellulaire est déterminé dans les cellules traitées et non traitées par FACS. Les cellules (2 x 10⁵) sont incubées dans PBS contenant 0,1% NaN₃ et 1% BSA (solution B) pendant 15 min à 4°C. Par la suite, les cellules sont colorées par 7A7 Mab (1 μ g/ml) diluées dans la solution B pendant 15 min à 4°C. Après lavage, des Ig totales anti-souris de chèvre FITC conjugués sont ajoutées (1:200; Pharmingen, EEUU). Après lavage, 10⁴ cellules requises en utilisant un cytomètre de flux FACScan (Becton Dickison). Les données obtenues sont analysées en utilisant le logiciel WinMDI (version 2.8). Le traitement IFN- α des cellules D122 ne changent pas l'expression EGFR (Figure 6).

Exemple 6: L'effet anti-métastatique de la combinaison de 7A7 Mab/ α -IFN sur la tumeur D122.

Les cellules D122 ($2,5 \times 10^5$) sont injectées dans la veine caudale latérale des souris C57BL/6 (10 souris par groupe). La co-administration de IFN- α (5×10^5 U/Kg, injection intrapéritonéale) et de 7A7 Mab (1 mg/kg, injection intraveineuse) comme le jour six après déclenchement de la tumeur et a continué trois fois par semaine jusqu'à la fin de l'essai. Trois semaines après injection de la tumeur, les souris sont sacrifiées, et les poumons sont enlevés. Le nombre de métastase de poumon D122 est compté. Les souris traitées par PBS ou 7A7 Mab ou α -IFN- sont utilisées en tant que témoin.

Dans cette expérience, les effets de 7A7 Mab et de α -IFN-anti-métastatique sur la tumeur D122 sont vérifiés (comme monothérapie), étant observés une réduction dans le nombre de métastase de poumon D122 dans les souris traitées par 7A7 et les souris traitées par α -IFN par rapport aux souris traitées par PBS (Figure 4/Table 1). Cependant, cet effet anti-métastatique est augmenté de façon significative une fois les souris ont reçu la thérapie combinée (Figure 7/Table 2) (PBS vs. AcM 7A7+ α -IFN: $p < 0,001$; AcM 7A7 vs AcM 7A7+ α -IFN: $p < 0,05$; α -IFN vs AcM 7A7+ α -IFN: $p < 0,05$, test Dunn).

PBS	7A7 Mab	α -IFN	7A7 Mab+ α -IFN
103	42	36	2

Table 2. Nombre de métastase médian des groupes expérimentaux.

20 **Description brève des schémas:**

Figure 1. Le nucléotide et les séquences déduites d'acides aminés de l'ADNc codant la région variable lourde de 7A7 Mab. Les acides aminés sont énumérés selon Kabat. Les espaces ont été introduites pour maximiser l'alignement. Le résidu d'acides aminés codé par chaque codon a donné ci-dessus la séquence de nucléotide.

25 **Figure 2.** Le nucléotide et les séquences déduites d'acides aminés de l'ADNc codant la région variable légère de 7A7 Mab. Les acides aminés sont énumérés selon Kabat. Les espaces ont été introduits pour maximiser l'alignement. Le résidu d'acides aminés codé par chaque codon a donné ci-dessus la séquence de nucléotide.

30 **Figure 3.** L'effet anti-métastatique de 7A7 Mab sur la tumeur de D122. Les souris C57BL/6 sont inoculées par les cellules D122 (modèle de métastase expérimental) et

traitées par le 7A7 ou le Mab témoin. Trois semaines après injection de la tumeur, les souris sont sacrifiées, et les poumons sont enlevés. Le nombre de métastase de poumon D122 est compté.

- 5 **Figure 4.** L'effet anti-métastatique 7A7 Mab sur la tumeur D122 est dépendant de cellules CD8⁺ T. Les souris C57BL/6 sont inoculées par les cellules D122 (modèle de métastase expérimental) et traitées par 7A7 ou Mab témoin. Les souris sont supprimées de populations à cellules positives CD8 en utilisant un anti-CD8 Mab. Trois semaines après injection de la tumeur, les souris sont sacrifiées, et les poumons sont enlevés. Le nombre de métastase de poumon D122 est compté.
- 10 **Figure 5.** Les niveaux de MHC I sont augmentés dans les cellules D122 et MB16F10 par un traitement par IFN- α . Les cellules D122 et MB16F10 sont traitées par IFN- α pendant 12 heures. Finalement, les cellules sont incubées par un Mab spécifique pour FITC de molécule H-2kb conjuguée. Le pourcentage de cellules positives H-2kb est mesuré par FACS.
- 15 **Figure 6.** Le traitement par IFN- α ne change par l'expression EGFR dans les cellules D122. Les cellules D122 sont traitées par α -IFN pendant 48 heures. Finalement, les cellules sont incubées par 7A7 Mab. Le pourcentage de cellules positives EGFR est mesuré par FACS.
- 20 **Figure 7.** L'effet anti-métastatique de traitement combiné 7A7 Mab/ α -IFN est supérieur aux traitements indépendant. Les souris C57BL/6 sont inoculées par les cellules D122 (modèle de métastase expérimentale) et traitées par 7A7 et α -IFN-. Trois semaines après injection de tumeur, les souris sont sacrifiées, et les poumons sont enlevés. Le nombre de métastase de poumon D122 est compté.

Compositions thérapeutiques pour améliorer l'effet de la thérapie par les anticorps contre le récepteur du facteur de croissance épidermique.

Revendication:

- 5 1. Une composition thérapeutique utile pour le traitement de cancer comportant l'administration simultanée ou périodique d'un anti-EGFR Mab et un ou plusieurs type I IFNs.
- 10 2. La composition thérapeutique selon la revendication 1 comportant un anticorps monoclonal contre le EGFR, l'interféron et un récepteur approprié pour l'injection intraveineuse.
- 15 3. La composition thérapeutique selon les revendications 1 et 2 où l'anticorps monoclonal contre le EGF R est un anticorps chimérique.
- 20 4. La composition thérapeutique selon la revendication 3 où l'anticorps monoclonal contre le EGF R est un anticorps humanisé.
5. La composition thérapeutique selon la revendication 4 où l'anticorps monoclonal contre le EGF R est un h-R3 d'anticorps humanisé produit par la lignée cellulaire avec le numéro d'enregistrement ECACC 951110101.
- 25 6. La composition thérapeutique selon les revendications 1 et 2 où l'interféron est un interféron de type I.
7. La composition thérapeutique selon la revendication 6 où l'interféron est un α -INF humain.

8. La composition thérapeutique selon la revendication 7 où l'interféron est un α -INF recombinant humain.
- 5 9. Une composition thérapeutique comportant l'anticorps humanisé anti EGFR h-R3 produite par la lignée cellulaire par rapport au numéro d'enregistrement ECACC 951110101 et le α -INF recombinant humain.
- 10 10. Les compositions thérapeutiques selon les revendications 1 à 9 comportant l'administration séquentielle de l'anticorps et l'interféron.
11. . Un kit pharmaceutique composé par un récipient avec un anti-EGFR Mab, un ou plusieurs récipients IFN et une étiquette ou des instructions additionnelles à un dosage et l'utilisation.

15

```

      1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
VH7A7  E V M L V E S G G V L V K P G G S L
      GAA GTG ATG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GTC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG
19B1  -----G-----

      CDR1
      19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36
VH7A7  K L S C A A S G F T F S R Y A M S W
      AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT AGG TAT GCC ATG TCT TGG
19B1  -----S-----C-----

      37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 52a 53
VH7A7  V R Q T P E K R L E W V A T I S S G
      GTT CGC CAG ACT CCG GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT
19B1  -----

      CDR2
      54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71
VH7A7  G S Y S Y Y P D S V K G R F T I S R
      GGT AGT TAT TCC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC AGA
19B1  -----C A-----

      72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82a 82b 82c 83 84 85 86
VH7A7  D N V K N T L Y L Q M S S L R S E D
      GAC AAT GTC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC
19B1  -----A-----C-----

      CDR3
      87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 101 102 103 104 105
VH7A7  T A M Y Y C A R D S G G P A Y W G Q
      ACG GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA GAC TCC GGT GGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA

      103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
VH7A7  W C Q G T L V T V S A
      TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA
    
```

5

Figura 1

10


```

      1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18
Vk7A7  D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R
      GAT ATC CAG  ATG ACA CAG ACT ACA TCC TC C CTG TCT GCC TCT CTG GGA G AC AGA
91A3  .....

      19 20 21  22 23  24 25 26 27 28  29 30 31 32 33 34  35 36
      V T I S C R A S Q D I S N Y L N W Y
Vk7A7  GTC ACC ATC  AGT TCC AGG GCA AGT CAG GA C ATT AGC AAT TAT TTA AAC TGG TAT
91A3  .....

      37 38 39  40 41  42 43 44 45 46  47 48 49  50 51 52  53 54
      Q Q K P D G T V K L L I Y Y T S R L
Vk7A7  CAG CAG AAA  CCA GAT GGA ACT GTT AAA CT C CTG ATC TAC TAC ACA TCA A GA TTA
91A3  .....

      55 56 57  58 59  60 61 62 63 64  65 66 67  68 69 70  71 72
      H S G V T S R F S G S G S G T D Y S
Vk7A7  CAC TCA GGA  GTC ACA TCA AGG TTC AGT GG C AGT GGG TCT GGA ACA GAT T AT TCT
      P
91A3  .....

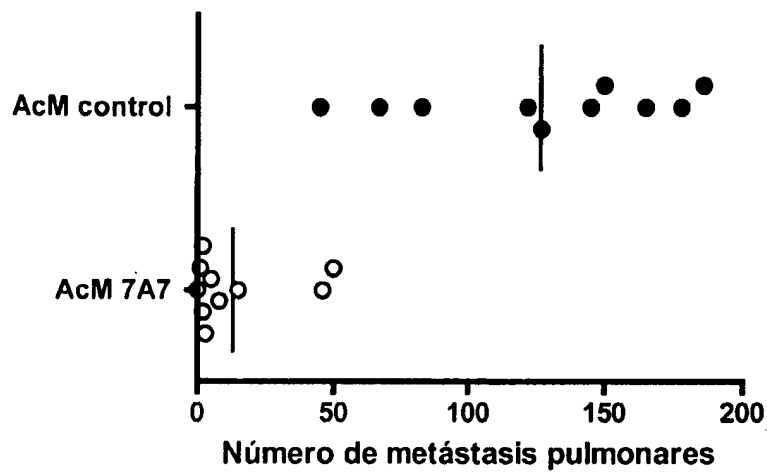
      73 74 75  76 77  78 79 80 81 82  83 84 85 86 87 88  89 90
      L T I S N L E Q E D I A T Y F C Q Q
Vk7A7  CTC ACC ATT  AGC AAC CTG GAG CAA GAA GA T ATT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG
91A3  .....

      91 92 93  94 95  96 97  98 99 100 101 102 103
      G N T L P W T P G G G T K
Vk7A7  GGT AAT ACG  CTT CCG TGG ACG TTC GGT GG A GGC ACC AAG

      103 104 105  106 106A 107 108 109
      K V B I K R A D
Vk7A7  AAG GTG GAA  ATC AAA CCG GCT GAT

```

Figura 2



5

Figura 3

10

5

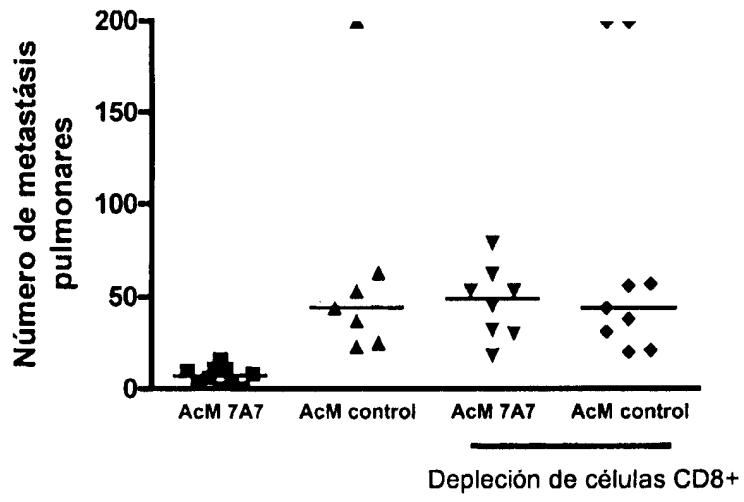


Figura 4

10

15

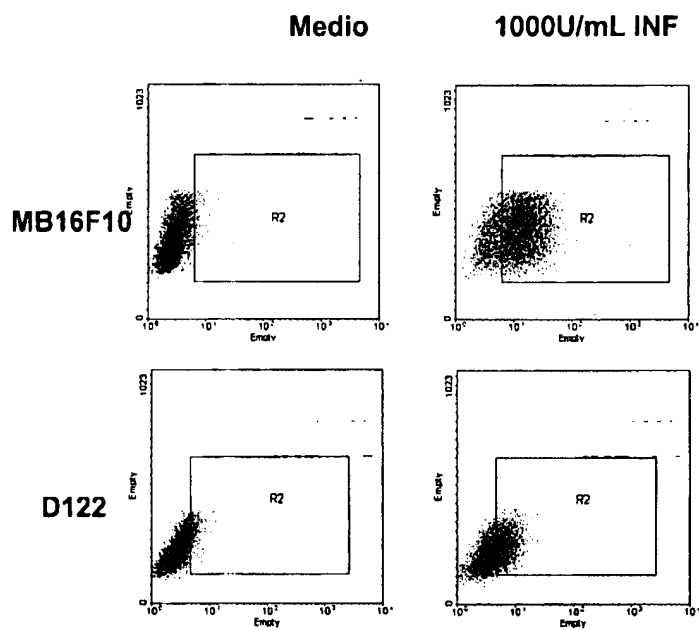


Figura 5

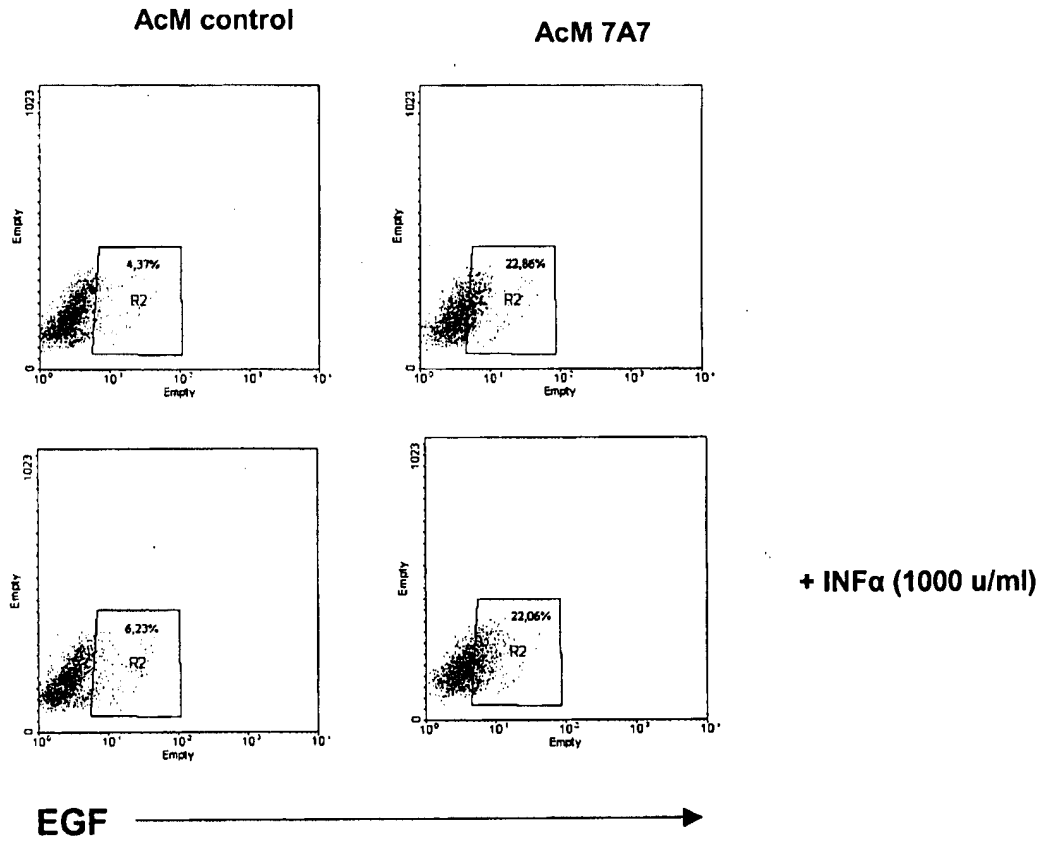


Figura 6

5

10

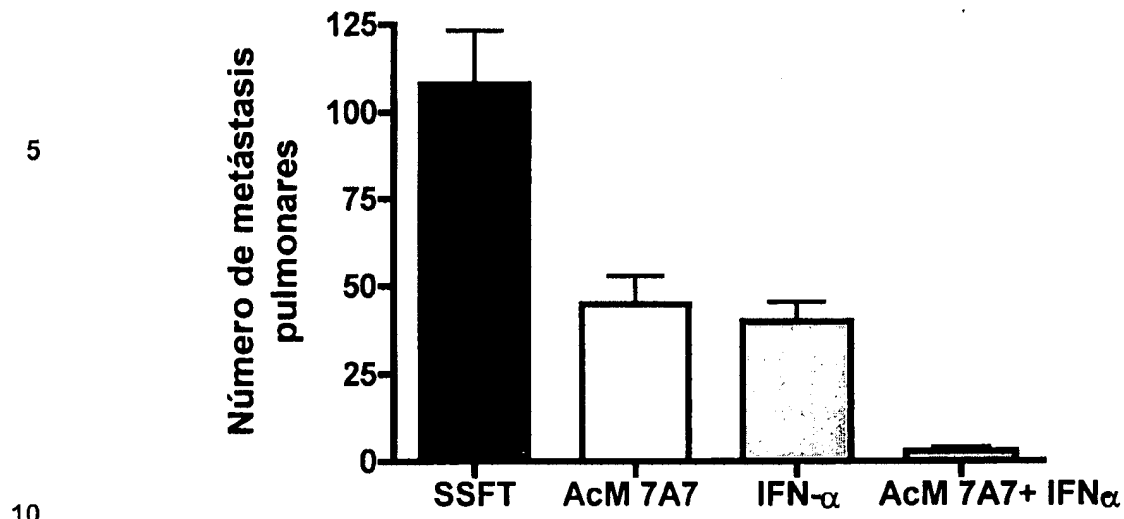


Figura 7