

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 242**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08716004 .0**
96 Fecha de presentación: **25.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2126565**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ANTICUERPOS
CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO I DE TIPO INSULINA.**

30 Prioridad:
27.02.2007 EP 07003948

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**EVERS, Stefan;
HINZ, Andreas y
KUENKELE, Klaus-Peter**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 375 242 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

Método para la evaluación de la actividad inhibitoria de anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento I de tipo insulina.

5 La presente invención se refiere a métodos para la evaluación de la actividad inhibitoria de anticuerpos contra el receptor de factor de crecimiento I de tipo insulina (IGF-1R), a métodos para la predicción de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de dichos anticuerpos y a métodos para la predicción de un resultado clínico de un tratamiento en un paciente al que se administra dicho anticuerpo.

10 El receptor del factor de crecimiento I de tipo insulina (antígeno IGF-1R, EC 2.7.112, CD 221) pertenece a la familia de las tirosina quinasas de la proteína de transmembrana (LeRoith, D., y otros, *Endocrin. Rev.* 16 (1995) 143-163; y Adams, T.E., y otros, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093). El IGF-1R se une a IGF-1 con elevada afinidad e inicia la respuesta fisiológica a este ligando in vivo. El IGF-1R se une también a IGF-2, no obstante, con una afinidad ligeramente menor. La sobre-expresión de IGF-1R promueve la transformación neoplásica de células y existen pruebas de que el IGF-1R está involucrado en la transformación maligna de células y, por lo tanto, es un objetivo útil para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer (Adams, T.E., y otros, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093). El factor de crecimiento I (IGF-I) de tipo insulina es un mitógeno importante para células de músculos lisos vasculares (VSMC). El receptor de IGF-I es un heterotetrámero compuesto de dos cadenas alpha extracelulares entrecruzadas y dos cadenas beta que abarcan la membrana, que contienen un dominio de tirosina-quinasa. Tiene un elevado grado de similitud de secuencia al receptor de insulina (IR) y el lugar de unión específico del ligando putativo ha sido localizado en una región rica en cisteína (CRR) de la cadena alpha (Adams, T. E., y otros, *Cell. Mol. Life Sci* 57 (2000) 1050-1093).

25 Los anticuerpos contra IGF-1R son bien conocidos en el estado de la técnica y han sido investigados en cuanto a sus efectos antitumorales in vitro e in vivo (Benini, S., y otros, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1790-1797; Scotlandi, K., y otros, *Cancer Gene Ther.* 9 (2002) 296-307; Scotlandi, K., y otros, *Int. J. Cancer* 101 (2002) 11-16; Brunetti, A., y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989) 212-218; Prigent, S.A., y otros, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9970-9977; Li, S.L., y otros, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252; Pessino, A., y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 1236-1243; Surinya, K.H., y otros, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16718-16725; Soos, M.A., y otros, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 12955-12963; Soos, M.A., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5217-5221; O'Brien, R.M., y otros, *EMBO J.* 6 (1987) 4003-4010; Taylor, R., y otros, *Biochem. J.* 242 (1987) 123-129; Soos, M.A., y otros, *Biochem. J.* 235 (1986) 199-208; Li, S.L., y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 92-98; Delafontaine, P., y otros, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26 (1994) 1659-1673; Kull, F.C. Jr., y otros, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566; Morgan, D.O., y Roth, R.A., *Biochemistry* 25 (1986) 1364-1371; Forsayeth, J.R., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 3448-3451; Schaefer, E.M., y otros, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13248-13253; Gustafson, T.A., y Rutter, W.J., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18663-18667; Hoyne, P.A., y otros, *FEBS Lett.* 469 (2000) 57-60; Tulloch, P.A., y otros, *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 11-18; Rohlik, Q.T., y otros, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149 (1987) 276-281; y Kalebic, T., y otros, *Cancer Res.* 54 (1994) 5531-5534; Adams, T. E., y otros, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093; Dricu, A., y otros, *Glycobiology* 9 (1999) 571-579; Kanter-Lewensohn, L., y otros, *Melanoma Res.* 8 (1998) 389-397; Li, S.L., y otros, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252). Los anticuerpos contra IGF-1R se describen también en muchas otras publicaciones, por ejemplo, Arteaga, C.L., y otros, *Breast Cancer Res. Treatment* 22 (1992) 101-106; y Hailey, J., y otros, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 1349-1353.

45 En particular, el anticuerpo monoclonal contra IGF-1R llamado α IR3 es ampliamente utilizado en la investigación de estudio de procesos mediados por IGF-1R y enfermedades mediadas por IGF-1 tales como cáncer. El anticuerpo alpha-IR-3 fue descrito por Kull, F.C., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566. Mientras tanto, se han editado aproximadamente un centenar de publicaciones que tratan con la investigación y utilización terapéutica de α IR3 con respecto a su efecto antitumoral, solo y junto con agentes citostáticos tales como doxorubicina y vincristina. El α IR3 es un anticuerpo monoclonal murino que se sabe que inhibe IGF-1 que se une al receptor de IGF pero no a IGF-2 que se une a IGF-1R. El α IR3 estimula a elevadas concentraciones la proliferación de células de tumor y la fosforilación de IGF-1R (Bergmann, U., y otros, *Cancer Res.* 55 (1995) 2007-2011; Kato, H., y otros, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2655-2661). Existen otros anticuerpos (por ejemplo, 1H7, Li, S.L., y otros, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252) que inhiben la unión de IGF-2 a IGF-1R de manera más potente que la unión de IGF-1. Un resumen del estado de la técnica de anticuerpo y sus propiedades y características se ha descrito por Adams, T.E., y otros, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093.

60 La mayor parte de los anticuerpos descritos en el estado de la técnica son de origen murino. Estos anticuerpos, tal como es bien conocido en el estado de la técnica, no son útiles para la terapia de pacientes humanos sin alteraciones adicionales, tales como quimerización o humanización. Basándose en estos inconvenientes, los anticuerpos humanos son claramente preferentes como agentes terapéuticos en el tratamiento de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374). Basándose en esta tecnología, se pueden producir anticuerpos humanos contra una gran variedad de objetivos. Se mencionan anticuerpos terapéuticos quiméricos, humanizados y humanos contra IGF-1R en los documentos WO 02/053596, WO 2004/071529, WO 2005/016967 WO 2006/008639, US 2005/0249730, US 2005/0084906, WO 2005/058967, WO 2006/013472, US 2003/0165502, WO 2005/082415,

WO 2005/016970, WO 03/106621, WO 04/083248, WO 2003/100008, WO 2004/087756, WO 2005/005635 y WO 2005/094376. Los inmunoensayos estándar de fase sólida con anticuerpos monoclonales comportan la formación de un complejo entre anticuerpo adsorbido en una fase sólida (anticuerpo captado), antígeno y anticuerpo a otro epítipo del antígeno conjugado con una enzima (anticuerpo trazador). De esta manera, se forma un sándwich: fase sólida - anticuerpo captado - antígeno - anticuerpo trazador. En la reacción catalizada por el sándwich, la actividad de la enzima conjugada al anticuerpo es proporcional a la concentración de antígeno en el medio de incubación. El método sándwich estándar se llama también inmunoensayo puente de antígeno doble porque los anticuerpos de captación y trazador se unen a diferentes epítopos del antígeno.

La invención se refiere a métodos para la evaluación de la actividad inhibitoria de anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento (IGF-1R) de tipo insulina, a métodos para la predicción de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de dichos anticuerpos y a métodos para la predicción de un resultado clínico de un tratamiento en un paciente, en el que se administra dicho anticuerpo. Los ensayos para la determinación de IGF-1R son bien conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, WO 02/053596, WO 2004/087756 y WO 2005/005635), no obstante se han utilizado como muestras células con sobre-expresión de IGF-1R (células 3T3) o se han llevado a cabo mediciones por citometría de flujo (Cohen, B.D., Clin. Cancer Res. 11 (2005) 2063-2073).

Existe una necesidad de medición y control del resultado farmacocinético y farmacodinámico de un tratamiento de un paciente con un anticuerpo contra IGF-1R. Esta medición y control se pueden llevar a cabo, por ejemplo, por medición de los niveles de expresión de IGF-1R (Kornprat, P., J. Clin. Path. 59 (2006) 202-206) o el estado de fosforilación de IGF-1R (Chen, J.W., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 284 (2003) e1149-e1155) en biopsias de tumores. También se ha sugerido medir el agotamiento de IGF-1R en pacientes (Cohen, B.D., Clin. Cancer Res. 11 (2005) 2063-2073). El tratamiento ex vivo de sangre con un anticuerpo contra IGF-1R ha resultado en la regulación descendente de IGF-1R en células mononucleares de sangre periférica humana, según el control por citometría de flujo.

Resumen de la invención

La invención comprende un método para la determinación de IGF-1R en una muestra de inmunoensayo en fase sólida, caracterizado porque dicha muestra es una preparación de linfocitos de sangre periférica de mamífero (PBL), sometida a lisis. Esta muestra es designada adicionalmente como "muestra de PBL sometida a lisis" o "PBL sometida a lisis". El mamífero es preferentemente un ser humano o un mono.

Se ha descubierto de manera sorprendente que, si bien el rango de expresión de IGF-1R en las PBL se encuentra comprendido entre 250 y 2.300 moléculas (Cohen, B.D., Clin. Cancer Res. 11 (2005) 2063-2073) es posible determinar IGF-1R en PBL sometidas a lisis por inmunoensayo en fase sólida, de acuerdo con la invención.

La invención comprende un método, de acuerdo con la misma, caracterizado por el hecho de que el nivel de proteínas de IGF-1R es determinado en una muestra de PBL sometida a lisis, como medida para la actividad in vivo de un anticuerpo contra IGF-1R administrada a dicho mamífero.

La invención comprende un método, según la invención, para la evaluación de la actividad in vivo de un anticuerpo contra IGF-1R en un mamífero tratado con dicho anticuerpo, caracterizado porque en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero, el nivel de la proteína IGF-1R está determinado como medición de la actividad in vivo de dicho anticuerpo.

La invención comprende un método, según la invención, para la predicción de una propiedad farmacodinámica o farmacocinética de un anticuerpo contra IGF-1R en un mamífero tratado con dicho anticuerpo, caracterizado porque en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero se determina el nivel de la proteína IGF-1R como medida de dicha predicción.

La invención comprende un método, según la misma, para la predicción del resultado clínico o determinación de un tratamiento en un paciente, en el que se ha administrado un anticuerpo contra IGF-1R, caracterizado por comprender las etapas de determinar el nivel de proteína en IGF-1R en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho paciente una primera vez, comparando dicho nivel de proteínas con dicho nivel determinado una segunda vez.

La invención comprende un método, según la misma, caracterizado porque el tiempo para sacar la muestra es, o bien antes y durante y/o después de la administración.

La invención comprende un método, según la misma, caracterizado porque el nivel de proteína de IGF-1R es medido por ELISA.

La invención comprende un método, según la misma, caracterizado porque el primer y segundo anticuerpos utilizados en el ensayo ELISA son dos anticuerpos monoclonales que se unen a diferentes epítopos o un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal contra IGF-1R.

- 5 Por lo tanto, se pueden utilizar un primer y un segundo anticuerpos contra IGF-1R para la fabricación de un ensayo inmunológico para la evaluación de la actividad in vivo de un tercer anticuerpo contra IGF-1R, en el que dicho mamífero ha sido tratado con dicho tercer anticuerpo, caracterizado porque en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero el nivel de proteínas de IGF-1R es determinado como medición de la actividad in vivo de dicho tercer anticuerpo.
- 10 Un primer y un segundo anticuerpos contra IGF-1R pueden ser utilizados, por lo tanto, para la fabricación de un ensayo inmunológico para la predicción de una propiedad farmacodinámica o farmacocinética de un tercer anticuerpo contra IGF-1R en un mamífero tratado con dicho tercer anticuerpo, caracterizado porque, en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero, el nivel de proteínas de IGF-1R es determinado como medición de dicha predicción.
- 15 Por lo tanto, se pueden utilizar un primer y un segundo anticuerpos contra IGF-1R para la fabricación de un ensayo inmunológico para la predicción del resultado clínico o la determinación del curso de tratamiento en un mamífero, en el que un tercer anticuerpo es administrado al paciente, caracterizado por comprender las etapas de determinar el nivel de proteína de IGF-1R en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero una primer vez, y comparar dicho nivel de proteínas con dicho nivel determinado una segunda vez.
- 20 En esta utilización, el tiempo de muestreo es antes, durante y/o después de la administración del tercer anticuerpo.
- 25 Para esta utilización, los anticuerpos utilizados en el ensayo inmunológico, preferentemente ELISA, son dos anticuerpos monoclonales que se unen a diferentes epítomos o un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal contra IGF-1R.
- 30 La invención comprende un método para la determinación de IGF-1R en una muestra de PBL sometida a lisis de un mamífero, caracterizado porque el nivel de proteína de IGF-1R en dichas PBL se determina preferentemente como medición de la actividad in vivo de un anticuerpo contra IGF-1R administrado a dicho mamífero.
- 35 La invención comprende un método para la evaluación de la actividad in vivo de un anticuerpo contra IGF-1R en una muestra de PBL sometida a lisis de un mamífero, habiendo sido tratado dicho mamífero con dicho anticuerpo, caracterizado porque el nivel de proteína de IGF-1R en dichas PBL se determina como medición para la actividad in vivo de dicho anticuerpo.
- 40 La invención comprende un método para la evaluación de la actividad in vivo de un anticuerpo contra IGF-1R en un mamífero tratado con dicho anticuerpo, caracterizado porque en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero se determina el nivel de proteína de IGF-1R como medida de dicha predicción.
- 45 La invención comprende además, un método para la predicción del resultado clínico o determinación de un curso de tratamiento en un paciente en el que se administra un anticuerpo contra IGF-1R, caracterizado por comprender las etapas de determinar el nivel de proteína de IGF-1R en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho paciente una primera vez, comparando dicho nivel de proteína con dicho nivel determinado una segunda vez. El tiempo para muestreo es, o bien antes, durante y/o después de la administración.
- 50 Todos estos métodos son llevados a cabo fuera del mamífero, y el nivel de proteína de IGF-1R es determinado in vitro.
- 55 Preferentemente, las PBL son aisladas de la muestra, preferentemente de la capa desnuda ("buffy-coat"), usualmente por centrifugación utilizando gradiente Ficoll, antes de llevar a cabo los métodos de determinación. Como muestra para los métodos, según la invención, se utiliza preferentemente un preparado de 10^6 a 10^8 células de PBL/250 μ l. Las PBL son sometidas a lisis y solubilizadas en una solución acuosa (por ejemplo, con tampón PBS). La lisis es llevada a cabo, por ejemplo, por la utilización de un alquilariil poliéter alcohol, tal como octilfenoxipolietoxietanol (Triton® X-100) o CHAPS (por ejemplo, 1% (v/v)).
- 60 Un primer y un segundo anticuerpos contra IGF-1R pueden ser utilizados, por lo tanto, para la fabricación de un ensayo inmunológico para la evaluación de la actividad in vivo de un tercer anticuerpo contra IGF-1R, en el que dicho mamífero ha sido tratado con dicho tercer anticuerpo, caracterizándose porque se determina el nivel de proteína de IGF-1R de dicho mamífero en una muestra de PBL sometida a lisis como medición para la actividad in vivo de dicho tercer anticuerpo.
- 65

Un primer y un segundo anticuerpos contra IGF-1R pueden ser utilizados, por lo tanto, para la fabricación de un ensayo inmunológico para la predicción de una propiedad farmacodinámica o farmacocinética de un tercer anticuerpo contra IGF-1R en un mamífero tratado con dicho tercer anticuerpo, caracterizándose porque se determina el nivel de proteína de IGF-1R de dicho mamífero en una muestra de PBL sometida a lisis, como medición de dicha predicción.

Un primer y un segundo anticuerpos contra IGF-1R pueden ser utilizados, por lo tanto, para la fabricación de un ensayo inmunológico para la predicción de un resultado clínico o para determinar un curso de tratamiento en un mamífero, en el que un tercer anticuerpo es administrado al paciente, comprendiendo las etapas de determinar el nivel de proteína de IGF-1R en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero en una primera vez, y comparando dicho nivel de proteína con dicho nivel determinado una segunda vez. El tiempo para el muestreo es antes y durante y/o después de la administración.

Los anticuerpos que puedan ser utilizados en los métodos de determinación de la invención son, preferentemente, dos anticuerpos monoclonales que se unen a diferentes epítopos o un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal. El primer anticuerpo es inmovilizado y el segundo anticuerpo es el anticuerpo de detección y contiene una etiqueta detectable.

Los anticuerpos que pueden ser utilizados para la invención se unen a IGF-1R humano (EC 2.7.1.112, SwissProt P08069) y preferentemente a la cadena alfa del receptor. Estos anticuerpos monoclonales útiles según la invención son, por ejemplo, descritos en los documentos WO 2004/087756 y WO 2005/005635. Este anticuerpo es utilizado también como tercer anticuerpo (terapéutico). Se depositaron líneas celulares de hibridoma produciendo anticuerpos monoclonales útiles en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania.

Línea celular	Nº de depósito	Fecha de depósito
<IGF-1R> HUMAB-Clon 22	DSM ACC 2594	09.05.2003
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18	DSM ACC 2587	10.04.2003
<IGF-1R> HUMAB Clon 1a	DSM ACC 2586	10.04.2003
<IGF-1R> HUMAB Clon 23	DSM ACC 2588	10.04.2003
<IGF-1R> HUMAB-Clon 8	DSM ACC 2589	24.04.2003

El anticuerpo que puede ser utilizado para la invención se caracteriza, además, por afinidad con respecto a IGF-1R de 10^{-8} M (K_D) o menos, preferentemente 10^{-9} M y más preferentemente y forma aproximada de 10^{-10} a 10^{-13} M.

El nivel de proteína de IGF-1R es determinado por un ensayo inmunológico, preferentemente mediante ELISA, de manera que se inmoviliza un anticuerpo. La inmovilización es llevada a cabo, preferentemente, mediante un par de unión biológica, que es preferentemente hapteno-antihapteno (tal como digoxigenina-anticuerpo contra digoxigenina) o biotina-(estrept)avidina. En una realización preferente de la invención, el primer anticuerpo es biotinilado e inmovilizado sobre una matriz de estreptavidina (u otro análogo de avidina). La biotinilación o acoplamiento de hapteno es llevada a cabo de manera tal que el anticuerpo retiente afinidad a IGF-1R de 10^{-9} M (K_D) o menos, preferentemente, de 10^{-10} a 10^{-13} M aproximadamente.

Preferentemente, el mamífero es un paciente humano en necesidad de una terapia tumoral o un mamífero no humano tratado para pruebas de animales in vivo.

Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" comprende las diferentes formas de anticuerpos, incluyendo, sin que ello sea limitativo, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de ingeniería genética. Preferentemente, uno de los primer y segundo anticuerpos es monoclonal y el otro es policlonal, procedente de un animal no humano, tal como un conejo o una cabra.

"Fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general, como mínimo, la parte de unión al antígeno o región variable del mismo, que es adecuada y útil para un ensayo, según la invención. Se incluyen entre los fragmentos de anticuerpos los fragmentos Fab y F (ab)₂.

El término “anticuerpo contra IGF-1R” o “anticuerpo IGF-1R”, tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a IGF-1R humano y que, por lo tanto, no muestra reactividad cruzada detectable con otras proteínas humanas.

5 El término “unión a IGF-1R”, tal como se utiliza en esta descripción, significa la unión de un anticuerpo a IGF-1R en un ensayo in vitro, preferentemente, en un ensayo de unión en el que el anticuerpo es unido a una superficie y se mide la unión de IGF-1R por Resonancia Superficial Plasmon (SPR). La unión significa afinidad de unión (K_D) de 10^8 M o menos, preferentemente de 10^9 M o menos y, más preferentemente de 10^{13} a 10^{10} M.

10 El término “actividad in vivo de anticuerpo contra IGF-1R”, tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a la bien conocida actividad para dichos anticuerpos que se une a IGF-1R y que inhibe la unión de ligandos. El bloqueo, mediado por anticuerpos, de la unión de ligandos a IGF-1R inhibe la señalización descendente de las dos rutas más importantes de factor de crecimiento (IGF) de tipo insulina, proteína quinasa activada por mitógeno, y fosfatidilinositol 3'-quinasa/Akt. Como resultado, el potencial mitogénico y proliferativo de IGF-1 y de IGF-2 se redujeron significativamente. Además, el anticuerpo induce internalización de IGF-1R y degradación de células de unión a tumor, con el resultado de una reducción significativa (por lo menos, 80%) en la superficie de las células presentando moléculas receptoras (ver, por ejemplo, Mitsiades, C.S., *Cancer Cell* 5 (2004) 221-230; Grimberg, A., *Cancer Biology & Therapy* 2 (2003) 630-635).

20 Se aislaron células mononucleares/linfocitos de sangre periférica a partir de capas leucocitarias de acuerdo con el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Rees, G. y Gough R., *J. Med. Lab. Tech.* 25 (1968) 117-118 y Figdor, C., y otros, *J. Immunol. Methods* 55 (1982) 221-229.

25 La determinación inmunológica de un anticuerpo contra IGF-1R tiene lugar por un doble inmunoensayo de puente de antígeno que comprende un cuerpo de captación (primer anticuerpo) y un anticuerpo trazador (segundo anticuerpo) conjuntado a la etiqueta detectable. El método ELISA sándwich se caracteriza por la medición de la concentración de antígeno utilizando dos tipos de anticuerpos IGF-1R monoclonales (el primer y el segundo anticuerpo) que reconocen diferentes epítopos del antígeno, alternativamente, con un tipo de anticuerpo de IGF-1R monoclonal y un tipo de anticuerpo de IGF-1R policlonal. El procedimiento de este ensayo ELISA en sándwich consiste, habitualmente, en tres etapas. Por ejemplo, en la primera etapa, una muestra que contiene antígeno es vertida en una placa de medición, en la que ha sido adsorbido el primer anticuerpo monoclonal/policlonal; se une IGF-1R de la muestra al primer anticuerpo. En la segunda etapa, las sustancias de la muestra distintas del antígeno son arrastradas por lavado con un agente de lavado. A continuación, en la tercera etapa, una solución del segundo anticuerpo, etiquetada con moléculas indicadoras tales como una enzima o radioisótopo, son vertidas sobre la placa; el anticuerpo etiquetado se une a IGF-1R habiéndose unido al primer anticuerpo y la etiqueta es detectada. Los métodos ELISA son bien conocidos en el estado de la técnica y han sido resumidos, por ejemplo, por Hildebrand R.L., *Rapid diagnosis in infectious disease*, Rytel, M.W. (ed.), Boca Raton (1979) pp. 71-88.

40 De manera preferente, se lleva a cabo la conjugación de un anticuerpo a su asociado de conjugación por unión de grupos ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfidril, hidroxil y/o fenólico del núcleo del aminoácido de un anticuerpo y/o grupos azúcar alcohol de la estructura de carbohidrato de un anticuerpo.

45 Preferentemente, el primer anticuerpo es inmovilizado mediante un par de unión específico. Este par de unión (primer componente/segundo componente) es, por ejemplo, estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (ver, por ejemplo, Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc. (1996)), lecitina/polisacárido, esteroide/proteína de unión a esteroide, hormona/receptor de hormona, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G, etc. Preferentemente, el primer anticuerpo es conjugado a biotina y se lleva a cabo la inmovilización a través de avidina inmovilizada o estreptavidina.

50 Alternativamente, el primer anticuerpo es conjugado con la fase sólida por adsorción pasiva. La adsorción pasiva es descrita, por ejemplo, por Butler, J.E., *Solid Phases in Immunoassay*, In: *Immunoassay*, Diamandis, E.P., y Christopoulos, T.K. (eds.), Academic Press, Inc., San Diego, California (1996), pp. 205-225.

55 En una realización preferente de la invención, el segundo anticuerpo es conjugado a una etiqueta detectable, preferentemente, conjugada a través de un par de unión específico. Este par de unión (primer componente/segundo componente) es, por ejemplo, estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (ver, por ejemplo, Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, California (1996)), lecitina/polisacárido, esteroide/proteína de unión de esteroide, hormona/receptor de hormona, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G, etc. Preferentemente, el segundo anticuerpo está conjugado vía digoxigenina y un anticuerpo contra digoxigenina a la etiqueta detectable. De manera alternativa, el segundo anticuerpo está conjugado a una etiqueta electroluminiscente, tal como un complejo de bispiridil rutenio.

65 Los anticuerpos monoclonales contienen como proteínas una serie de cadenas laterales reactivas. Estos grupos químicos reactivos de anticuerpos son, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa amino), grupos tiol (cistinas, cisteína y metionina), grupos de ácido carboxílico (ácido aspártico, ácido glutámico) y grupos azúcar alcoholes.

Se describen soportes sólidos para los inmunoensayos, según la invención, de manera amplia en el estado de la técnica (ver por ejemplo, Butler, J.E., *Methods* 22 (2000) 4-23).

5 Los principios de diferentes inmunoensayos se describen, por ejemplo, por Hage, D.S., en *Anal. Chem.* 71 (1999) 294R-304R. Lu, B., y otros en *Analyst.* 121 (1996) 29R-32R, informe sobre la inmovilización orientada de anticuerpos para utilización de inmunoensayos. Los inmunoensayos mediados por avidina-biotina son informados, por ejemplo, por Wilchek, M., y Bayer, E.A., *Methods Enzymol.* 184 (1990) 467-469.

10 Los anticuerpos monoclonales y sus dominios constantes contienen como proteínas una serie de cadenas laterales reactivas para acoplarse a un miembro de unión, tal como una superficie, una proteína, un polímero tal como PEG, celulosa o poliestireol, una enzima o un elemento de un par de unión. Son grupos reactivos químicos de anticuerpos, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteínas y metioninas), grupos ácido carboxílico (ácidos aspárticos, ácidos glutámicos) y grupos azúcar alcohol. Estos métodos son descritos, por
15 ejemplo, por Aslam, M. y Dent, A., *Bioconjugation*, MacMillan Reference Ltd. (1999), pp. 50-100.

El término "fase sólida" significa una sustancia no fluida, e incluye partículas (incluyendo micropartículas y gránulos) fabricadas a partir de materiales, tales como polímeros, metales (partículas paramagnéticas, ferromagnéticas), vidrio y cerámica; sustancias gel tales como sílice, alúmina y geles de polímeros; capilares, que
20 pueden estar realizados a base de polímeros, metal, vidrio y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; bandas sólidas; y cubetas, tubos y otros contenedores de muestras de espectrómetro. Un componente de fase sólida de un ensayo se distingue con respecto a superficies sólidas inertes con las que el ensayo puede estar en contacto por el hecho de que la "fase sólida" contiene, como mínimo, un
25 componente en su superficie destinado a interactuar con el segundo anticuerpo. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, banda, cubeta o placa de microtitulación, o puede ser algún componente no estacionario, tal como gránulos y micropartículas. Las micropartículas pueden ser utilizadas también como fase sólida para formatos de ensayo homogéneo. Se puede utilizar una variedad de micropartículas que permiten la fijación no covalente o covalente de proteínas y otras sustancias. Estas partículas incluyen
30 partículas de polímeros tales como poliestireno y poli (metilmetacrilato); partículas de oro tales como monopartículas de oro y coloides de oro; y partículas de cerámica tales como sílice, vidrio y partículas de óxidos metálicos. Ver, por ejemplo, Martin, C.R., y otros, *Anal. Chem.* 70 (1998) 322A-327A. Son ejemplos de etiquetas detectables lo cromógenos (grupos y colorantes fluorescentes o luminiscentes), enzimas, grupos activos NMR o partículas metálicas, haptenos, por ejemplo, digoxigenina. La etiqueta detectable puede ser también un grupo reticulante fotoactivable, por ejemplo, un grupo azido o un grupo azirina. También son grupos preferentes emisores
35 de señales los quelatos metálicos que pueden ser detectados por electroluminiscencia, con particular preferencia en quelatos de rutenio, por ejemplo, quelato de rutenio (bispiridil)₃²⁺. Se describen grupos de etiquetado de rutenio adecuados, por ejemplo, en los documentos EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 y WO 92/14138.

Los siguientes elementos y figuras se facilitan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo
40 verdadero alcance está determinado por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

45 **Figura 1** Se midieron los niveles de las mismas muestras en cinco experimentos independientes etiquetados 1 a 5. Los mismos colores indican muestras idénticas. Las desviaciones estándar estaban comprendidas entre 11 y 14%.

50 **Figura 2** Leucocitos periféricos aislados de forma reciente de *Cynomolgus* (población inicial) fueron comprobados en cuanto a su concentración de IGF-1R y se comparó con un cultivo de una noche de las células (sin tratar) y un cultivo de una noche de las células tratadas con anticuerpo 18 (tratadas). En el panel de la izquierda se indican unidades arbitrarias por mg de proteína.

Ejemplo 1

55 **Aislamiento y lisis de PBL**

a) Aislamiento de PBL humanos

60 200µl de Liqueimine (Roche Diagnostics GmbH, DE) fueron añadidos a 160 ml de RPMI/Hepes (10 mM Hepes tampón en RPMI). Las células de sangre periférica o capa leucocitaria ("Buffy coats") de 0,5 l de sangre fueron resuspendidos en esta solución. La separación de los tipos de células de sangre se llevó a cabo en tubos 50 ml GREINER Leucosep (Artículo N°. 7.227.290). Se utilizaron seis tubos para el aislamiento de las PBL de una capa leucocitaria. Para preparar los tubos se transfirieron a cada tubo 15 ml de Medio de Selección de Linfocito (LSM, ICN N°. 50494) y los tubos fueron centrifugados a 1000 x g durante 30 segundos. 39 ml de la suspensión de sangre fueron aplicados en forma de capa sobre la solución de LSM y centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos a
65

18°C. Los PBL aparecen como banda de color blanco directamente por encima del septo y se recuperaron con una pipeta de 10 ml y se transfirieron a cuatro tubos de 50 ml. Los tubos fueron llenados posteriormente hasta 50 ml con RPMI/Hepes y centrifugados a 250 x g durante 10 minutos a 18°C. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en un pequeño volumen de RPMI/Hepes. Todas las células fueron combinadas en un único tubo de 50 ml y lavadas contra RPMI/Hepes. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en 10 ml de ALT precalentado para lisis de los eritrocitos contaminantes. Se preparó ALT por combinación de 300 ml de solución A (0,16 M NH₄Cl) con 100 ml de solución B (0,18 M Tris-HCl, pH 7,65), ajustando el pH a 7,2 y esterilizando la solución por filtrado (0,22 µm). Después de incubación de la suspensión de células en ALT durante 3 minutos a 37°C, el tubo fue llenado hasta 50 ml con RPMI/Hepes y las células fueron centrifugadas a 250 x g durante 5 minutos. Finalmente, las células fueron lavadas nuevamente dos veces en RPMI/Hepes y resuspendidas en 50 ml de RPMI/Hepes. Finalmente, las células fueron contadas. Alternativamente a las células recién preparadas también se utilizaron PBL recién congeladas en algunos casos. Para la congelación, las células fueron resuspendidas en un medio de congelación (10% de DMSO en suero humano inactivado por calor) a una densidad de 10 millones de células/ml. La suspensión es enfriada lentamente hasta -80°C. Para la descongelación, las células son descongeladas rápidamente, y a continuación, diluidas lentamente sin agitación por adición de medio por etapas.

b) Aislamiento de PBL de Cynomolgus

Se recogió en contenedores de vacío, sangre (24 ml, 3 ml de cada uno de 8 monos diferentes) conteniendo heparina. Se añadieron 56 ml de PBS y la suspensión fue dispuesta en capas sobre la parte superior de un soporte de LSM (ICN No. 50494). Los tubos fueron centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos. Se retiraron las PBL, se lavaron dos veces en PBS y se contaron.

c) Tratamiento de PBL

Fueron sembradas entre dos y 10 millones de células por pocillo en 2 ml de medio (RPMI con 10% FCS) en placas de cultivo de células de 6 pocillos. Los controles se dejaron sin tratamiento. A la mitad de los pocillos se añadió anticuerpo contra IGF-1R (2,0 mg/ml) hasta una concentración final de 100 nM. Las células fueron incubadas durante una noche a 37°C y con 5% CO₂. Como control, se centrifugó una parte alícuota de células y se congeló antes de la etapa de cultivo de células para el análisis posterior.

d) Lisis de PBL

Las células fueron recogidas por centrifugación y lavadas dos veces en PBS. Las pastillas fueron congeladas. Poco antes del análisis, las pastillas de células fueron descongeladas y resuspendidas en 200 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Triton-X-100, 20% glicerol), sometidas a vortex, colocadas en un baño de agua con ultrasonidos durante 2 minutos y centrifugadas.

Ejemplo 2

Ensayo ELISA

El receptor de IGF-1 en linfocitos de sangre periférica es captado por un anticuerpo biotinilado contra el dominio α del receptor en una microplaca recubierta con estreptavidina (SA-MTP) (anticuerpo 18). Se detecta IGF-1R unido por un anticuerpo de IGF-1R policlonal de conejo y anticuerpo acoplado anti-conejo HRP.

Se midió el nivel de IGF-1R como cantidad de proteína IGF-1R con respecto a la cantidad total de proteína de la célula. Los lisados de células fueron producidos, ajustados a la misma concentración de proteína y medidos en un ensayo ELISA. En el rango lineal del ensayo, la señal de absorción de 450 nm corresponde a la cantidad relativa de nivel de IGF-1R.

Materiales:

- Placas de poliestireno con recubrimiento de estreptavidina, de 96 pocillos (Nunc)
- PBST: Solución de tampón 10xPBS diluida 1:10 con H₂O + 0,2% Tween20
- BSA
- PAK<IGF-1Rβ>Ra-C20-IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-713)
- PAK<Conejo>G-IgG-HRP (Cell Signaling #7074)
- 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina
- 1M H₂SO₄
- MAK<IGF-1Rα>Hu-AK1α-IgG (DSM ACC 2586) biotinilado.

Recubrimiento de placas:

- anticuerpo biotinilado diluido 1:200 en 3% BSA/PBST

- añadir 100 µl/pocillo a SA-MTP
- incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador
- lavar con 200 µl PBST/pocillo

5 **Preparación de la muestra:**

- Después de lavado con PBS, se vuelven a aislar por centrifugación, linfocitos de sangre periférica (PBL, 1×10^7 células) y las pastillas de células son solubilizadas en 250 µl de tampón de lisis. Para asegurar que las concentraciones de IGF-1R de los lisados se encuentran en agrupación lineal del ensayo ELISA, se tiene que llevar a cabo una serie de diluciones.

Proceso de ensayo:

- añadir 100 µl/pocillo de muestra a la placa de ensayo
- incubar durante 1h a temperatura ambiente
- lavar con 200 µl PBST/pocillo
- añadir 100 µl/pocillo PAK<IGF-1Rβ>Ra-C20-IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-713) 1:1000 en 3% BSA/PBST a la placa
- incubar durante 1h a temperatura ambiente
- lavar con 200 µl PBST/pocillo
- añadir 100 µl/pocillo PAK<Conejo>G-IgG-HRP 1:5000 en 3% BSA/PBST a la placa
- incubar durante 1h a temperatura ambiente
- lavar con 200 µl PBST/pocillo
- añadir 100 µl/pocillo 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina a la placa de ensayo
- incubar durante 0,5h a temperatura ambiente
- interrumpir la reacción con 25 µl/pocillo 1M H₂SO₄
- medir absorción a 450 nm

En ausencia de proteína pura recombinante, la señal ELISA obtenida con una dilución 1:100 del control positivo fue definida como unidad arbitraria "U". Se midieron diferentes diluciones de la muestra y se calcularon las medias de, como mínimo, dos valores.

Determinación de los cambios de niveles de IGF-1R en cultivos de PBL tratados con anticuerpo contra IGF-1R:

PBL de 20 donantes fueron cultivadas en presencia y ausencia de anticuerpo 18. Nueve de las muestras procedían de stocks congelados, once fueron determinadas con células preparadas recientemente. Se determinó la regulación descendente de niveles de IGF-1R después de 24 horas de tratamiento con anticuerpo contra IGF-1R. En todos los cultivos de células se redujeron los niveles de IGF-1R en el anticuerpo tratado en comparación con las células no tratadas. Los niveles de IGF-1R, después de tratamiento variaban entre 0 y 62% de los niveles detectados en los cultivos de control. Por lo tanto, la regulación descendente del receptor se muestra como fenómeno general después de la regulación descendente de la cascada de señales por el anticuerpo terapéutico. Los niveles de expresión de receptor de la línea base variaron fuertemente entre donantes, de manera que parece probable que los niveles "umbral" no pueden ser establecidos y se tendrá que determinar un curso temporal de los niveles en la totalidad del periodo de tratamiento para cada paciente, incluyendo valores antes del tratamiento como controles de línea base. Para 19/20 donantes, los niveles antes del cultivo celular eran más bajos que los niveles después del cultivo celular (sin tratamiento). No obstante, para 17/20 donantes estos niveles eran todavía más elevados que los medidos en los cultivos celulares después de tratamiento con el anticuerpo terapéutico.

Para dos preparados de células, la reducción de niveles de IGF-1R fue comprobada con diferentes concentraciones de huMab. Incluso valores más bajos de IGF-1R fueron detectados a concentraciones más bajas (figuras 1 y 2).

A efectos de confirmar que el ensayo puede ser aplicado en monos Cynomolgus, en experimentos pre-clínicos, se llevó a cabo una incubación de PBL de mono y sin anticuerpo terapéutico. Igual que en las muestras humanas, la concentración de la regulación descendente de IGF-1R fue detectada en linfocitos de Cynomolgus. Las proporciones de regulación descendente de niveles de receptor fueron comparables a las detectadas con material humano.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la determinación de IGF-1R en una muestra por inmunoensayo en fase sólida, caracterizado porque dicha muestra es un preparado de linfocitos de sangre periférica de mamífero sometidos a lisis (muestra de PBL sometida a lisis).
2. Método, según la reivindicación 1, caracterizado porque el mamífero es un ser humano o un mono.
- 10 3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el nivel de proteína de IGF-1R es determinado como medición para la actividad in vivo de un anticuerpo contra IGF-1R administrado a dicho mamífero.
4. Método para la evaluación de la actividad in vivo de un anticuerpo contra IGF-1R en un mamífero tratado con dicho anticuerpo, caracterizado porque en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero, el nivel de proteína de IGF-1R es determinado como medición para la actividad in vivo de dicho anticuerpo.
- 15 5. Método para la predicción de una característica farmacodinámica o farmacocinética de un anticuerpo contra IGF-1R en un mamífero tratado con dicho anticuerpo, caracterizado porque en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho mamífero, el nivel de proteína de IGF-1R es determinado como medición de dicha predicción.
- 20 6. Método para la predicción de los resultados clínicos o determinación de un curso de tratamiento en un paciente al que ha sido administrado un antídoto contra IGF-1R, caracterizado por comprender las etapas de determinar el nivel de proteína de IGF-1R en una muestra de PBL sometida a lisis de dicho paciente, una primera vez, comparar dicho nivel de proteína con dicho nivel determinado una segunda vez.
- 25 7. Método, según la reivindicación 6, caracterizado porque el tiempo para el muestreo es o bien antes, durante y/o después de la administración.
8. Método, según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el nivel de proteína de IGF-1R es medido por ELISA.
- 30 9. Método, según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el primer y segundo anticuerpos utilizados son dos anticuerpos monoclonales que se unen a diferentes epítomos de un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal contra IGF-1R.

Fig. 1

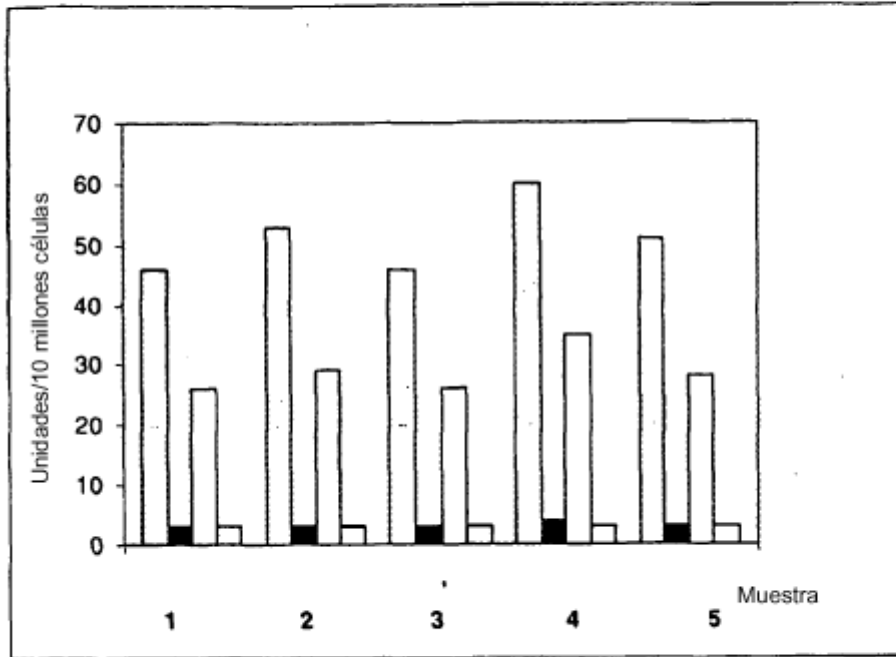


Fig. 2

