

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 971**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2007** **E 07734765 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012** **EP 2027470**

54 Título: **Ensayo de células tumorales circulantes**

30 Prioridad:

02.06.2006 US 810811 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2013

73 Titular/es:

**PFIZER PRODUCTS INCORPORATED (100.0%)
EASTERN POINT ROAD
GROTON, CT 06340, US**

72 Inventor/es:

**GUALBERTO, ANTONIO;
MRS LUISA MARIA PACCAGNELLA;
MELVIN, CARRIE LYNN;
REPOLLET, MADELINE I.;
CHIANESE, DAVID ALLEN;
CONNELLY, MARK CARLE y
TERSTAPPEN, LEONARDUS, WENDELINUS,
MATHIAS, MARIE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 971 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

Ensayo de células tumorales circulantes

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a los campos de oncología y de pruebas diagnósticas, y más particularmente a procedimientos para la exploración del cáncer para predecir y controlar las repuestas al tratamiento con quimioterapia, la recurrencia del cáncer o similares.

El factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1) es un polipéptido de 7,5 kD que circula en plasma a concentraciones elevadas y puede detectarse en la mayoría de los tejidos. El IGF-1, que es estructuralmente similar a la insulina, estimula la diferenciación y proliferación celular y es necesario para la mayoría de los tipos de células de los mamíferos para una proliferación sostenida. Estos tipos de células incluyen, entre otros, fibroblastos diploides humanos, células epiteliales, células del músculo liso, linfocitos T, células neuronales, células mieloides, condrocitos, osteoblastos y células madre de la médula ósea.

La primera etapa en la ruta de la transducción que conduce a la proliferación o diferenciación celular, estimuladas por el IGF-1, es la unión del IGF-1 o del IGF-2 (o insulina a concentraciones suprafisiológicas) al receptor del IGF-1 (IGF-1R). El IGF-1R pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento de la tirosina quinasa (Ullrich y col., Cell 61: 203-212, 1990) y es estructuralmente similar al receptor de insulina (Ullrich y col., EMBO J. 5: 2503-2512, 1986).

Los estudios epidemiológicos sugieren que niveles normales del IGF-1 en el límite superior incrementan el riesgo de cánceres tales como el de pulmón, mama, próstata y colorrectal, al compararse con individuos con niveles normales del IGF-1 en el límite inferior. Además, existen muchas pruebas acerca del papel del IGF-1 y/o IGF-1R en el mantenimiento de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Los niveles del IGF-1R son elevados en tumores de pulmón (Kaiser y col., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 119: 665-668, 1993; Moody y col., Life Sciences 52: 1161-1173, 1993; Macaulay y col., Cancer Res., 50: 2511-2517, 1990), mama (Pollak y col., Cancer Lett. 38: 223-230, 1987; Foekens y col., Cancer Res. 49: 7002-7009, 1989; Arteaga y col., J. Clin. Invest. 84: 1418-1423, 1989), próstata y colon (Remaole-Bennet y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 75: 609-616, 1992; Guo y col., Gastroenterol. 102: 1101-1108, 1992). La alteración de la expresión del IGF-1 en el epitelio prostático conduce a neoplasia en ratones transgénicos (DiGiovanni y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 97: 3455-3460, 2000). Además el IGF-1 parece ser un estimulador autocrino de gliomas humanos (Sandberg-Nordqvist y col., Cancer Res. 53 (11): 2475-78, 1993), al mismo tiempo que se ha demostrado que el IGF-1 estimula el crecimiento de fibrosarcomas que sobreexpresan IGF-1R (Butler y col., Cancer Res. 58: 3021-3027, 1998). Véase Macaulay, Br. J. Cancer, 65: 311-20, 1992 para una revisión sobre el papel que juega la interacción entre IGF-1/ IGF-1R en el crecimiento de diversos tumores humanos.

Utilizando vectores de expresión antisentido u oligonucleótidos antisentido frente al ARN del IGF-1R, se ha demostrado que la interferencia con el IGF-1R conduce a la inhibición del crecimiento celular mediado por el IGF-1 (véase, por ejemplo, Wraight y col., Nat. Biotech. 18: 521-526, 2000). También puede inhibirse el crecimiento utilizando análogos peptídicos del IGF-1 (Pietrkowski y col., Cell Growth y Diff. 3: 199-205, 1992; Pietrkowski y col., Mol. Cell. Biol. 12: 3883-3889, 1992), o un vector que exprese un ARN antisentido para el ARN del IGF-1 (Trojan y col., Science 259: 94-97, 1992). Además, los anticuerpos contra el IGF-1R (Arteaga y col., Breast Canc. Res. Treatm. 22: 101-106, 1992; y Kalebic y col., Cancer Res. 54: 5531-34, 1994), y los mutantes negativos dominantes del IGF-1R (Prager y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91: 2181-85, 1994; Li y col., J. Biol. Chem. 269: 32558-2564, 1994; Jiang y col., Oncogene 18: 6071-6077, 1999), **pueden** invertir el fenotipo transformado, inhibir la tumorigénesis, e inducir la pérdida del fenotipo metastático.

El IGF-1 también es importante en la regulación de la apoptosis. La apoptosis, que es la muerte celular programada, está implicada en diversos procesos del desarrollo, incluida la maduración de los sistemas nervioso e inmunológico. Además de su papel en el desarrollo, la apoptosis también se ha implicado como un protector celular importante contra la tumorigénesis (Williams, Cell 65: 1097-1098, 1991; Lane, Nature 362: 786-787, 1993). La supresión del programa apoptótico puede contribuir al desarrollo y progresión de neoplasias malignas.

El IGF-1 protege de la apoptosis por la retirada de citocinas en células hematopoyéticas dependientes de IL-3 (Rodríguez-Tarduchy, G. y col., J. Immunol. 149: 535-540, 1992), y de la retirada de suero en células Rat-1/mycER de rata (Harrington, E. y col., EMBO J. 13: 3286-3295, 1994). La demostración de que los fibroblastos dirigidos por *c-myc* dependen del IGF-1 para su supervivencia sugiere que existe un papel importante del receptor de IGF-1 en el mantenimiento de células tumorales mediante la inhibición específicamente de la apoptosis, un papel distinto de los efectos proliferativos del IGF-1 o IGF-1R.

Los efectos protectores del IGF-1 sobre la apoptosis dependen de la presencia del IGF-1R en las células para interaccionar con el IGF-1 (Resnicoff y col., Cancer Res. 55: 3739-3741, 1995). Una confirmación de una función anti-apoptótica del IGF-1R en el mantenimiento de las células tumorales la proporcionó también un estudio que utilizando oligonucleótidos antisentido para el IGF-1R identificó una relación cuantitativa entre los niveles de IGF-1R, la extensión de la apoptosis y el potencial tumorigénico de un tumor singénico de rata (Resnicoff y col., Cancer Res. 55: 3739-3741, 1995). Se ha descubierto que la sobreexpresión del IGF-1R protege a las células tumorales *in vitro*

de la apoptosis inducida por etopósido (Sell y col., Cancer Res. 55: 303-06, 1995) e, incluso más espectacularmente, que una disminución de los niveles del IGF-1R por debajo de los niveles del tipo silvestre causaba una apoptosis masiva de células tumorales *in vivo* (Resnicoff y col., Cancer Res. 55: 2463-69, 1995).

Algunos estudios sugieren que los niveles de expresión del IGF-1R están correlacionados con resultados clínicos. En modelos tumorales, el IGF-1R modula la proliferación celular, la supervivencia y la metástasis e induce resistencia a terapias dirigidas. La inhibición del IGF-1R incrementa significativamente la actividad de agentes citotóxicos (Cohen, B. y col., Clin. Cancer Res. 11 (5): 2063-73). La inhibición de la señalización del IGF-1R se presenta como una estrategia prometedora para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

Los tumores malignos de tejidos epiteliales son las formas de cáncer más comunes y son responsables de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer. Debido a los avances en el tratamiento quirúrgico de estos tumores, la mortalidad se relaciona cada vez más con la metástasis precoz y la recurrencia, que a menudo están ocultas en el momento del diagnóstico primario (Racila y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 95: 4589-94, 1998; Pantel y col., J. Nat'l. Cancer Inst. 91 (13): 1113-24, 1999). Por ejemplo, la localización anatómica distante hace que sea poco probable que en esos órganos se detecten tumores antes de haber invadido estructuras vecinas y crezcan hasta un tamaño mayor de 1 cm. Incluso con respecto a los cánceres de mama, el 12-37% de pequeños tumores de cáncer de mama (<1 cm) detectados por mamografía ya han sufrido metástasis en el momento del diagnóstico (Chadha M. y col., Cancer 73 (2): 350-3, 1994).

Las células tumorales circulantes (CTC) son células de origen epitelial que están presentes en la circulación de pacientes con diferentes neoplasias malignas sólidas. Derivan de clones del tumor primario y son malignas. (Véase Fehm y col., Clin. Cancer Res. 8: 2073-84, 2002). En la bibliografía se han acumulado pruebas que muestran que las CTC, pueden considerarse como un diagnóstico independientemente de la progresión de carcinomas cancerosos (Beitsch y Clifford, Am. J. Surg. 180 (6): 446-49, 2000 (mama); Feezor y col., Ann. Oncol. Surg. 9 (10): 944-53, 2002 (colorrectal); Ghossein y col., Diagn. Mol. Pathol. 8 (4): 165-75, 1999 (melanoma, próstata, tiroides); Glaves, Br. J. Cancer 48: 665-73, 1983 (pulmón); Matsunami y col., Ann. Surg. Oncol. 10 (2): 171-5, 2003 (gástrico); Racila y col., 1998; Pantel y col., 1999).

La detección y recuento de las células tumorales circulantes es importante para el cuidado de los pacientes por varias razones. Pueden detectarse antes que el tumor primario, permitiendo así realizar un diagnóstico precoz. Disminuyen en respuesta a la terapia, por lo que la posibilidad de realizar recuentos de CTC permite comprobar la eficacia de un régimen terapéutico determinado. Pueden utilizarse como herramienta para controlar la recurrencia en pacientes con enfermedades que no pueden medirse con adyuvantes. Por ejemplo, en el 36% de los pacientes con cáncer de mama entre 8 y 22 años después de mastectomía se detectaron CTC, aparentemente procedentes de micrometástasis (depósitos de células tumorales únicas o grupos muy pequeños de células neoplásicas). Meng y col., Clin. Can. Res. 10 (24): 8152-62, 2004.

Además, las CTC pueden usarse para predecir la supervivencia libre de progresión (PFS) y la supervivencia total (OS), ya que se ha observado que la presencia/número de células tumorales circulantes se correlaciona con la PFS y la OS. Véase Cristofanilli y col., J. Clin. Oncol. 23 (1): 1420-1430, 2005; Cristofanilli y col., N. Engl. J. Med. 351 (8): 781-791, 2004. El documento WO2005/016967 desvela un procedimiento para predecir y controlar la eficacia de la terapia con un antagonista del IGF-1R midiendo el IGF-1R en tumores aislados.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de ensayos rápidos y fiables que sean más sensibles que la mera detección de las CTC.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una superposición de histogramas de la tinción con ficoeritrina del IGF-1R de diversas líneas celulares.

La FIG. 2 es un conjunto de imágenes de microscopía de fluorescencia de células MCF-7 de cáncer de mama (Panel A) y células T-24 de la vejiga (Panel B) marcadas

La FIG. 3 es un conjunto de imágenes de microscopía de fluorescencia de posibles células tumorales circulantes.

La FIG. 4 es una representación gráfica del número total de células tumorales circulantes y células tumorales circulantes positivas a IGF-1R de cuatro pacientes tratados con un anticuerpo anti-IGF-1R.

La FIG. 5 es una representación gráfica del número total de células tumorales circulantes y células tumorales circulantes positivas a IGF-1R de cuatro pacientes tratados con un anticuerpo anti-IGF-1R en combinación con docetaxel.

La FIG. 6 es una representación gráfica del número total de células tumorales circulantes y células tumorales circulantes positivas a IGF-1R de cuatro pacientes tratados con un anticuerpo anti-IGF-1R en combinación con paclitaxel y carboplatino.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otra manera en la presente memoria descriptiva, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención deberán tener los significados normalmente entendidos por los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular

incluirán plurales y los términos en plural incluirán el singular.

Cada año en Estados Unidos, se diagnostican más de 1 millón de nuevos casos de cáncer; aproximadamente el cáncer, o complicaciones asociadas con su tratamiento, produce una de cada cinco muertes en este país. Continuamente se realizan esfuerzos considerables para mejorar el tratamiento y el diagnóstico de esta enfermedad. La mayoría de pacientes no mueren por el tumor primario; más bien sucumben a las metástasis: múltiples colonias tumorales dispersas establecidas por células malignas que se separan del tumor original y viajan a través del organismo, a menudo hasta lugares distantes. Desgraciadamente, las colonias con metástasis son frecuentemente más difíciles de detectar y eliminar que el tumor primario y a menudo no es posible tratarlas todas satisfactoriamente. La capacidad de las células malignas para metastatizarse sigue siendo uno de los mayores obstáculos para el tratamiento del cáncer y puede estar acelerada por el receptor de IGF-1. Véase, por ejemplo, Bahr y col., Growth Factors 23: 1-14, 2005.

Basándose en la complejidad del cáncer y en la metástasis del cáncer y en la frustración en el tratamiento de los pacientes con cáncer durante años, se han hecho muchos intentos para desarrollar ensayos de diagnóstico para guiar el tratamiento y controlar los efectos de dicho tratamiento sobre la metástasis o la recaída. Tales ensayos también podrían usarse presumiblemente para detectar el cáncer, reemplazando los ensayos relativamente burdos tales como la mamografía para tumores de mama o los exámenes digitales rectales para los cánceres de próstata.

En vista del conocimiento de la relación del IGF-1 e IGF-1R con ciertos cánceres, se emprendieron estudios para evaluar el efecto de los anticuerpos anti - IGF-1R sobre el número de células tumorales circulantes y su expresión de IGF-1R, así como la eficacia clínica de los anticuerpos. Recientemente se ha desarrollado un ensayo para detectar y realizar recuentos de células tumorales circulantes que expresan IGF-1R (CTC positivas a IGF-1R) que es útil en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, y mejor que los procedimientos anteriores de la técnica que implicaban a las CTC. El ensayo puede contribuir a entender mejor las funciones biológicas del receptor de IGF-1. Por ejemplo, aunque se ha supuesto que, para desencadenar el fenotipo de célula tumoral invasiva/metastásica se necesitan niveles elevados de IGF-1R, la relación entre los niveles de expresión de IGF-1R y el potencial metastásico aún no se ha aclarado por completo. Últimamente se ha encontrado que los pacientes con recuentos altos de CTC positivas al IGF-1R parecían tener tumores más agresivos como se evidenciaba por la progresión rápida de la enfermedad. Una posible relación entre la expresión aumentada de IGF-1R y el potencial metastásico podría ser por tanto la base para la detección de las CTC positivas al IGF-1R como un indicador de resultados pobres y/o intervención terapéutica.

Inicialmente, los procedimientos de ensayo de CTC positivas al IGF-1R de la presente invención son útiles para la detección precoz de un tumor, o para confirmar un diagnóstico. También pueden usarse para evaluar pronósticos.

Los procedimientos de la presente invención son también útiles para planificar tratamientos. Se ha encontrado que pacientes con células tumorales circulantes positivas al IGF-1R antes del tratamiento sean probablemente más respondedores a la terapia con antagonistas del IGF-1R en comparación con otros pacientes. Explorando a pacientes para detectar anticuerpos IGF-1R positivos antes del inicio del cualquier tratamiento, es posible pre-seleccionar una población que sea probablemente más respondedora a la terapia con antagonistas de IGF-1R y, en consecuencia, planificar un régimen de tratamiento. Los usos posibles de los ensayos con CTC positivas al IGF-1R como biomarcadores de anticuerpos anti - IGF-1R podrían incluir la identificación de una dosis biológica óptima, la selección de la dosis y el régimen de tratamiento y la determinación de la duración del mismo.

Se ha descubierto que hay una buena correlación entre cambios en el nivel de CTC positivas a IGF-1R en la sangre con quimioterapia y estado clínico. En vista de esta correlación, también es posible evaluar la respuesta del paciente al tratamiento, o la progresión de la enfermedad utilizando los procedimientos de ensayo de la presente invención. La medición de los receptores del IGF-1 en las células tumorales circulantes proporciona un auténtico criterio de valoración farmacodinámico (PD). Una vez que el tratamiento ha comenzado, la medición del IGF-1R en las células tumorales puede usarse para determinar si se ha alcanzado la inhibición máxima de la diana, sin alcanzar la dosis máxima tolerada (MTD). También puede comprobarse el desarrollo de resistencia a un determinado tratamiento. Un beneficio adicional de la presente invención es que el efecto del fármaco puede determinarse más frecuentemente midiendo las CTC que por medios tradicionales.

Finalmente, los procedimientos de la presente invención también pueden utilizarse para detectar la recurrencia de un tumor, incluso en ausencia de síntomas clínicos.

Los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse junto con el diagnóstico y/o tratamiento de neoplasias malignas no hematológicas, incluyendo los cánceres de mama, próstata, ovarios, pulmón y colon, particularmente cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) y el cáncer de próstata resistente a terapia hormonal (HRPC).

La exploración de pacientes con múltiples tipos de tumores indica que las CTC y las CTC positivas a IGF-1R se detectan frecuentemente en pacientes con HRPC. La identificación de estas células en HRPC puede tener implicaciones en el pronóstico y en la terapia. De hecho, en un estudio previo, se descubrió que la presencia de las CTC era el parámetro predictivo de supervivencia más significativo en pacientes con HRPC (Moreno y col., Urology 65: 713-718, 2005). Estudios múltiples han establecido un papel del IGF-1R en el desarrollo del cáncer de próstata,

y los datos *in vitro* sugieren que la expresión aumentada del IGF-1R y/o su actividad está asociada con la progresión del fenotipo resistente a terapia hormonal (Hellawell y col., Cancer Res., 62: 2942-2950, 2002; Chott y col., Am. J. Pathol. 155: 1271-1279, 1999). En un estudio descrito en la presente memoria descriptiva, los pacientes con HRPC que al incorporarse al estudio se consideraron positivos a IGF-1R (es decir, al menos se detectó una CTC positiva a IGF-1R) tenían un nivel medio de PSA en suero más alto que los pacientes en los que no se detectaban CTC. Además, los niveles de PSA y los recuentos de CTC y CTC positivas a IGF-1R cambiaban en paralelo durante la respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad. Previamente se ha demostrado que los pacientes con HRPC progresiva metastásica tenían recuentos de CTC significativamente más altos que los del grupo de enfermedad precoz, y en dos pacientes se comunicó un descenso en los recuentos de CTC una semana después del tratamiento inicial con docetaxel (Moreno y col., 2005, citado anteriormente). Sin embargo, ambos pacientes avanzaron, mostrando un aumento en los recuentos de CTC y los niveles de PSA a pesar de dosis adicionales de docetaxel. Los estudios descritos en la presente memoria descriptiva sugieren que los descensos prolongados en los recuentos de CTC solo se asocian con respuesta a la terapia en HRPC. Por tanto, los recuentos de CTC pueden proporcionar información sobre el pronóstico independientemente del nivel de PSA. Principalmente, datos preclínicos indican que los cambios en el PSA en respuesta al tratamiento anti - IGF-1R reflejan cambios en el crecimiento del tumor de próstata (Wu y col., Clin. Cancer Res. 11: 3065-3074, 2005).

También se ha encontrado que la proporción de respondedores a la terapia combinada de anticuerpos anti- IGF-1R y docetaxel era mayor en los pacientes con CTC positivas a IGF-1R detectables al incorporarse al estudio en comparación con los pacientes en los que estas células no se detectaron. Además, se observaron respuestas tardías en pacientes CTC negativos a IGF-1R, que no estaban necesariamente asociadas a beneficios clínicos (véase, por ejemplo, Petrylak y col., J. Nat'l Cancer Inst. 98: 516-521, 2006). Estos datos sugieren un posible uso del recuento de CTC IGF-1R para identificar pacientes con HRPC que pudieran beneficiarse de la terapia anti - IGF-1R.

Los procedimientos de la presente invención pueden usarse en la planificación y/o el control del tratamiento con diversos compuestos quimioterapéuticos que inhiban la señalización del IGF-1R. Particularmente se prefieren anticuerpos anti-IGF-1R, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 7.037.498 y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0069539. Otros anticuerpos anti- IGF-1R preferidos incluyen F-50035 y MK-0646 (Pierre Fabre/Merck); 19D12 (Shering-Plough); R1507 (Roche/Genmab); EM-164/AVE-1642 (Immunogen/Sanofi-Aventis); IMC-A12 (ImClone Systems); AMG479 (Amgen); así como los anticuerpos descritos en la Solicitud de Patente Internacional N° WO2006/069202; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0147612; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0084906; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0249730; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0018191; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0136063; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0235582; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0265307; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0228859; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0008642; Solicitud de Patente Europea N° 1622942; y Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005/0048050.

Otras clases de moléculas adecuadas para su uso con la presente invención incluyen aptámeros peptídicos que se unen específicamente al IGF-1R, moduladores de IGF-1R oligonucleotídicos antisentido e inhibidores de IGF-1R de molécula pequeña. Los inhibidores de IGF-1R de molécula pequeña preferidos incluyen OSI-906 (OSI Pharmaceuticals); AEW-541 (Novartis); BMS-536924 y BMS-554417 (Bristol-Myers Squibb); INSM-18 (Insmad); AG-1024 (Pfizer); XL228 (Exelixis); picropodofilina, y los desvelados en las Solicitudes de Patente Internacional Nos WO2004/043962 y WO2004/054996.

Como se establece posteriormente con mayor detalle, los procedimientos de la presente invención implican la retirada selectiva de células que tienen determinados sitios antigénicos reactivos de una muestra de un paciente. Los procedimientos y aparatos para dicha retirada selectiva son bien conocidos por un experto en la materia. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.551.435; 4.795.698; 4.925.788; 5.108.933 y 5.200.084; y la Publicación de Solicitud de Patente N° 2004/0157271. En una realización preferida, las células de interés se aíslan inmunomagnéticamente de la muestra del paciente usando ferrofluídos. Los ferrofluídos contienen partículas magnéticas diminutas en una suspensión coloidal cuyo flujo puede controlarse por imanes o campos magnéticos.

Para que la presente invención se entienda mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen un propósito meramente ilustrativo y de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

En los ejemplos expuestos en la presente memoria descriptiva, se extrajeron muestras de sangre de sujetos humanos en diversas localizaciones geográficas en Tubos con conservante CELLSAVE (Immunicon, Huntingdon Valley, PA), se evacuaron 10 ml de la sangre extraída en tubos que contenían un conservante celular para preservar la morfología celular y la expresión de antígenos de superficie de las células. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente y se procesaron como se ha descrito anteriormente a las 72 horas de la extracción de la sangre.

La respuesta del paciente al tratamiento se evaluó radiológicamente utilizando los Criterios de Respuesta a la Evaluación de Tumores Sólidos (RECIST) (véase Therasse y col., J. Nat'l Cancer Inst. 92: 205-216, 2000) o, en los pacientes con HPRC, usando los criterios del grupo de trabajo de antígeno prostático específico (PSAWG) (véase Bubley y col., J. Clin. Oncol. 17: 3461-3467, 1999).

5 Ejemplo 1

Desarrollo del ensayo del IGF-1R en células tumorales circulantes

Cultivo celular y adición celular: Las líneas celulares MCF-7 de cáncer de mama, PC3-9 de próstata, T-24 de vejiga y CEM hematopoyética, se cultivaron en matraces que contenían medio de cultivo celular RPMI-1640 complementado con FCS al 10% y posteriormente se recogieron usando tripsina. Las suspensiones celulares se usaron únicamente cuando su viabilidad superaba el 90% al evaluarse por exclusión con azul de tripán. Para determinar el número de células real, una alícuota de 50 µl de las células se permeabilizó y se marcó con fluorescencia por adición de 200 µl de PBS que contenía saponina al 0,05% y 10 µl de anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina conjugados con ficoeritrina (PE) a una concentración final de 0,5 µg/ml. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µl de tampón y 20 µl de perlas fluorescentes (Beckman-Coulter, Inc., Miami, FL) que contenían aproximadamente 20.000 perlas en total. Tubos duplicados que contenían solo perlas se procesaron sobre por un citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Biosciencias, San Jose, CA) hasta que se aspiró el 100% de la muestra. Esto proporcionó una estimación precisa del número de perlas presente en 20 µl. Los tubos del experimento se ensayaron por triplicado en el citómetro de flujo hasta que se contaron 10.000 perlas en cada tubo. La concentración de células se determinó utilizando el número conocido de perlas por unidad de volumen. Para la detección del IGF-1R se estimó que el número de células añadidas era entre 130 y 220 en 7,5 ml de sangre.

Aislamiento y recuento de las CTC: para el aislamiento de células de sangre se prepararon muestras y se analizaron utilizando el sistema CELLTRACKS (Immunicon, Huntingdon Valley, PA), que consiste en un sistema CELLTRACKS AUTOPREP, un kit de reactivo y el Analizador CELLSPOTTER. El sistema CELLTRACKS AUTOPREP es un sistema de preparación de muestras automático para la detección de células inusuales. El kit de reactivo está constituido por ferrofluidos revestidos con anticuerpos contra células enriquecidas inmunomagnéticamente, un cóctel de anticuerpos conjugados con fluorescencia (anticuerpos conjugados con PE y alofococianina (APC) para marcar células epiteliales y leucocitos respectivamente), un colorante nuclear, y tampones para lavar, permeabilizar y resuspender las células. Para la detección de células de carcinoma, 7,5 ml de sangre se mezclaron con ferrofluidos revestidos con anticuerpos dirigidos contra el antígeno asociado a tumores EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial, o antígeno de superficie celular epitelial): Después del enriquecimiento inmunomagnético, se añadieron anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) que reconocían citoqueratinas 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 y 19, anticuerpos marcados con APC que reconocían el antígeno leucocitario CD45, anticuerpos marcados con PE que reconocían el IGF-1R, y el colorante 4', 6- diamidino-2-fenilindol (DAPI) para ácidos nucleicos junto con un tampón de permeabilización para marcar con fluorescencia las células marcadas inmunomagnéticamente. Después de la incubación en el sistema, la separación magnética se repitió y el exceso de reactivos de tinción se aspiró. En la etapa final del proceso, las células se resuspendieron en el dispositivo de presentación celular MAGNEST (Immunicon, Huntingdon Valley, PA). Este dispositivo está constituido por una cámara y dos imanes que, para realizar el análisis, orientan las células marcadas inmunomagnéticamente utilizando un microscopio de fluorescencia.

El dispositivo MAGNEST se colocó sobre el Analizador CELLSPOTTER, un microscopio de fluorescencia semi-automático de cuatro colores. Se capturaron fotogramas de imágenes que cubrían toda la superficie del cartucho de cada uno de los cuatro cubos de filtro fluorescente. Las imágenes capturadas que contenían objetos que cumplían con los criterios predeterminados se presentaron automáticamente en un buscador de Internet desde el que el operador realizó la selección final de las células. Los criterios para que un objeto se defina como una CTC incluyen una morfología de oval a redondeada, un núcleo visible (positivo a DAPI), una tinción positiva a la citoqueratina, y ausencia de expresión de CD45 (determinada por tinción negativa a APC del CD45). Los resultados del recuento de las células se expresaron siempre como el número de células por 7,5 ml de sangre.

Selección de anticuerpos contra el IGF-1R y detección del IGF-1R en líneas celulares tumorales: en células MCF-7 de la línea celular de cáncer de mama se realizó la titulación de anticuerpos anti-IGF-1R, 1H7 (conjugado PE; BD Biosciencias, San Jose, CA) y 33255.111 (R8D Systems, Miniápolis, MN). Los experimentos de bloqueo cruzado no demostraron inhibición lo que sugería que estos anticuerpos se unían a epítomos diferentes y no competitivos del IGF-1R. Los experimentos de bloqueo cruzado con el anticuerpo anti IGF-1R humano, CP-751.871 (Pfizer Inc.; véase Patente de Estados Unidos N° 7.037.498) mostraron que el anticuerpo 33255.111 estaba completamente bloqueado de la unión a células por cantidades esencialmente equimolares de CP-751.871. Sin embargo, el anticuerpo 1H7 no mostró inhibición de unión en presencia de CP-751.871. Estos datos demuestran que el 33255.111 y el CP-751.871 se unen a los mismos epítomos o a epítomos relacionados. Dado que la unión del anticuerpo 1H7 al IGF-1R no se bloquea en presencia de CP-751.871, el 1H7 se seleccionó para una evaluación posterior.

La densidad antigénica se evaluó en la línea celular hematopoyética CEM, en la línea celular de cáncer de próstata PC3-9, en la línea celular de vejiga T-24 y en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 por tinción con el

anticuerpo anti-IGF-1R, 1H7, marcado con PE seguido de análisis flujocitométrico. La FIG. 1 muestra una superposición de histogramas de la tinción con IGF-1R-PE de las líneas celulares. La tinción de las células CEM fue similar a la de los controles y por tanto la densidad del IGF-1R estaba por debajo del límite de detección. La tinción IGF-1R-PE de las células PC3-9 pudo determinarse a partir del fondo y las células T24 y MCF-7 tenían claramente una tinción más brillante. La estimación de la densidad antigénica se obtuvo calibrando el citómetro de flujo con perlas con un número conocido de moléculas de PE. La densidad del IGF-1R en las células PC3-9 fue de aproximadamente 10.000 antígenos IGF-1R, en las células T-24 de aproximadamente 50.000 antígenos IGF-1R y en las células MCF-7 de aproximadamente 1.000.000 antígenos IGF-1R.

Ensayo de caracterización del IGF-1R: El ensayo de CTC convencional utilizando el sistema CELLTRACKS utiliza PE para la detección de citoqueratina presente en las células de origen epitelial, APC para la detección de CD45 presente en las células de origen hematopoyético, y FITC para la detección de reactivos específicos de analito en CTC definidas como células nucleadas positivas a citoqueratina, negativas a CD45. La limitación actual de detección de los Analizadores CELLSPOTTER para la detección de antígenos con anticuerpos marcados con FITC es de aproximadamente 100.000 antígenos por célula. Para incrementar esa sensibilidad, el ensayo de CTC se reconfiguró para bajar el límite de detección para la detección del IGF-1R. La citoqueratina expresada a altas densidades en las células epiteliales se marcó con FITC, lo que permitió el uso de anticuerpos anti-IGF-1R marcados con PE. En experimentos distintos se añadieron de 130 a 200 células PC3-9, T-24 o MCF-7 a 7,5 ml de sangre y se prepararon con los reactivos de tinción nuevamente configurados. Después de la preparación las muestras se escanearon en el Analizador CELLSPOTTER. El analizador se reconfiguró de manera que los sucesos citoqueratina positiva a FITC, nucleados DAPI positivos se presentaron al usuario como candidatos de CTC.

En el Panel A de la FIG. 2 se muestra un ejemplo típico de células MCF-7 recuperadas de 7,5 ml de sangre. La fila superior muestra un grupo de 3 células MCF-7 que expresan claramente el receptor IGF-1R, la señal junto a la imagen compuesta indica que el operador clasificó la célula como una CTC y la señal junto a la imagen que muestra la tinción del IGF-1R indica que el operador clasificó que esta CTC expresaba el IGF-1R. Todas las células mostradas en el Panel A expresaban claramente el receptor IGF-1R. En la sangre de dieciséis individuos sanos en la que se añadieron células MCF-7 el 80,6% (SD7,7) de las células MCF-7 recuperadas se clasificaron como CTC que expresaban IGF-1R. En el Panel B de la FIG. 2 se muestra un ejemplo típico de células T-24 recuperadas de 7,5 ml de sangre. La expresión de IGF-1R de las cuatro células T-24 fue claramente más oscura en comparación con la tinción del IGF-1R de las células MCF-7 y el operador solo clasificó las dos células de la parte inferior como CTC que expresaban el receptor IGF-1R. En la sangre de seis individuos sanos en la que se añadieron células T-24, el 13,6% (SD3,9) de las células MCF-7 recuperadas se clasificaron como CTC que expresaban IGF-1R. En la sangre de seis individuos sanos en la que se añadieron células PC3-9, el 3,8% (SD6,0) de las células MCF-7 se clasificaron como CTC que expresaban IGF-1R. Estos datos proporcionan una orientación para saber la densidad antigénica de IGF-1R en las CTC de pacientes con carcinomas metastásicos que es necesaria para detectarse en este ensayo.

Expresión del IGF-1 en las CTC en carcinomas metastásicos: En 7,5 ml de sangre de 139 individuos sanos apenas había CTC (0 CTC en 135 y 1 CTC en 4). Para ensayar si realmente el IGF-1R podía detectarse, o no, en las CTC en pacientes con carcinomas metastásicos, se ensayaron muestras de sangre de 50 pacientes. Se detectaron CTC en 7,5 ml de sangre en 11 de los 50 pacientes (22%). Entre estos 50 pacientes, 18 tenían cáncer de mama y en el 28% se detectaron CTC, 13 tenían cáncer colorrectal y en el 31% se detectaron CTC, 3 tenían cáncer de próstata y en el 33% se detectaron CTC, 12 tenían cáncer de pulmón y se detectaron CTC en el 8% y no se detectaron CTC en ninguno de los 4 pacientes con cáncer de ovario. En la FIG 3 se muestran ejemplos de las CTC detectadas. En la figura se muestran ocho candidatos a CTC. Los sucesos 1, 4, 5, 7 y 8 se clasificaron como CTC y solo las CTC de las filas 1 y 4 se clasificaron como CTC que expresaban IGF-1R. Obsérvese que en las filas 5 y 7 puede observarse una posible tinción de IGF-1R pero esto no se consideró suficiente para clasificarlas como CTC positivas a IGF-1R. La tabla 1 muestra el número de CTC detectadas en los 11 pacientes con CTC, el número de CTC que expresaban IGF-1R, y la proporción de CTC que expresaban IGF-1R. En 8 de los 11 pacientes (91%) se detectaron CTC que expresaban IGF-1R. Sin embargo, la proporción de CTC que expresaban IGF-1R era muy variable.

Tabla 1

	CTC	CTC (+) IGF-1R	% de CTC (+) IGF-1R
Mama	180	47	26
	25	11	44
	5	1	20
	4	1	25

(continuación)

	CTC	CTC (+) IGF-1R	% de CTC (+) IGF-1R
Colorrectal	6	1	17
	5	0	0
	4	0	0
	2	0	0
	1	1	100
Próstata	16	1	6
Pulmón	2	1	50

Ejemplo 2Expresión de IGF-R en las CTC en un estudio en fase 1 de búsqueda de dosis de anticuerpos anti - IGF-1R

5 El estudio 1 fue un estudio en fase 1 de búsqueda de dosis diseñado para definir la seguridad y tolerabilidad de un anticuerpo anti- IGF-1R completamente humano como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.037.498 en pacientes con tumores sólidos avanzados. En este estudio, el tratamiento con anticuerpos anti-IGF-1R se administró cada 21 días (ciclo de 21 días) a dosis de 3 a 20 mg/kg. Para evaluar el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-IGF-1R sobre el número de CTC y CTC que expresan IGF-1R en estos pacientes, se extrajeron muestras de sangre para su exploración, el día 1 pre-dosificación y el día 8 del estudio de cada ciclo de tratamiento de 21 días. Si el paciente abandonaba el estudio debido a la progresión de la enfermedad, se tomaba una muestra adicional. Durante el estudio, para realizar el recuento de las CTC, veintiséis pacientes proporcionaron muestras de sangre.

Dieciséis de los veintiséis pacientes (61%) tuvieron una o más CTC en algún momento del estudio (pre-dosificación o durante el tratamiento). En tres de los dieciséis pacientes con CTC detectadas en algún momento del estudio, no se detectó ninguna CTC positiva a IGF-1R. En dos casos solo se detectó una CTC en 7,5 ml de sangre. Los niveles de CTC y de CTC positivas a IGF-1R se representaron en relación al tiempo y se observaron diversos patrones de respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-IGF-1R. En la FIG. 4 se representan cuatro ejemplos. En el Panel A, se muestran recuentos CTC de un paciente tratado con una sola dosis de 6 mg/kg de anticuerpos anti-IGF-1R. En este paciente, el número de CTC y de CTC positivas a IGF-1R disminuyó el día 8 del tratamiento con anticuerpos anti-IGF-1R y ya no pudo detectarse el día 15 para luego reaparecer antes de empezar el ciclo 2. En el Panel B, se muestran recuentos CTC de un paciente tratado con una sola dosis de 10 mg/kg de anticuerpos anti-IGF-1R. Tras un ligero descenso de las CTC después de 8 y 15 días de tratamiento, el número de CTC y CTC positivas a IGF-1R aumentó cuando el paciente se retiró del estudio. Este paciente presentaba una progresión de la enfermedad por tomografía computarizada, CT. En el Panel C se muestran recuentos CTC de un paciente tratado con una sola dosis de 20 mg/kg de anticuerpos anti-IGF-1R. El número de CTC y de CTC positivas IGF-1R no se vio afectado excepto por la adición de CTC 15 días después de la administración de la dosis. El Panel D muestra recuentos CTC de un paciente tratado con una sola dosis de 3 mg/kg de anticuerpo anti-IGF-1R en el que casi todas las CTC expresaban IGF-1R. Se observó un aumento de CTC cuando el paciente se retiró del estudio. Una posible interpretación de estos datos es que la mayoría de las células tumorales circulantes en estos pacientes expresaban IGF-1R y el tratamiento con anticuerpos anti-IGF-1R parece que bloqueaba una señal de supervivencia necesaria para la preservación de las CTC. Como alternativa, el efecto del anticuerpo anti-IGF-1R puede producirse directamente en la masa tumoral, inhibiendo la migración de las CTC.

A pesar de la variabilidad, después de la dosificación, se observó un descenso en el número de CTC y de CTC positivas a IGF-1R así como una recuperación en el número de células circulantes al final del ciclo de tratamiento. También se observaron aumentos en el número de CTC y de CTC positivas a IGF-1R en las visitas de seguimiento posteriores al estudio. Estos datos refuerzan el papel de los ensayos con CTC y CTC positivas a IGF-1R en el control de la respuesta clínica y biológica contra anticuerpos anti-IGF-1R.

Ejemplo 3Expresión de IGF-1R en las CTC en un estudio de anticuerpos anti-IGF-1R en combinación con Docetaxel

40 El estudio 2 fue un estudio en fase 1b de búsqueda de dosis de un anticuerpo anti -IGF-1R completamente humano como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.037.498 en combinación con docetaxel (TAXOTERE) en pacientes con tumores sólidos avanzados. El docetaxel y los anticuerpos anti-IGF-1R se administraron el día 1 y el día 22 a dosis de 75 mg/m² y 0,1-10 mg/kg, respectivamente. Para realizar el recuento de las CTC, veintisiete pacientes proporcionaron muestras de sangre, incluyendo diecinueve pacientes con cáncer de próstata resistente a

hormonas (HRPC). Las muestras de CTC se recogieron en cada ciclo el día 1 previo a la dosis y el día 8.

Diecinueve de los veintisiete pacientes (70%) tuvieron una o más CTC en algún momento del estudio. Solamente en uno de los diecinueve pacientes con CTC detectadas en algún momento del estudio, no se detectaron CTC positivas a IGF-1R. Curiosamente, en las 5 evaluaciones de CTC de este paciente, se detectaron CTC y no se detectaron CTC positivas a IGF-1R, lo que sugería que, en este paciente, el sitio tumoral en sí mismo no expresaba el IGF-1R.

En la mayoría de los pacientes se observaron disminuciones en el número de CTC en respuesta al tratamiento. Los niveles de CTC y de CTC positivas a IGF-1R se representaron con respecto al tiempo y se observaron diversos patrones de respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-IGF-1R. En la FIG. 5 se representan cuatro ejemplos. El Panel A representa el número de CTC y CTC positivas a IGF-1R en un paciente con cáncer de próstata resistente a hormonas tratado con 10 mg/kg de anticuerpos anti-IGF-1R y 75 mg/m² de docetaxel (en ciclos de 21 días). Al seguir el tratamiento, el número total de CTC disminuyó como respuesta al tratamiento de combinación. Los valores de PSA (antígeno prostático específico) obtenidos de este paciente confirmaron una respuesta clínica al tratamiento. Además, en este paciente, aproximadamente el 50% de las CTC fueron originalmente positivas a IGF-1R antes de la terapia con anticuerpos anti-IGF-1R/docetaxel; el número de CTC positivas a IGF-1R descendió rápidamente con el tratamiento. Como el efecto biológico de los anticuerpos anti-IGF-1R es inducir la regulación a la baja del IGF-1R, estos datos apoyan posibles papeles de los ensayos con CTC y CTC positivas a IGF-1R en el control de la actividad biológica (biomarcador) y clínica de los anticuerpos anti-IGF-1R. El Panel B representa un paciente con un descenso similar en el número de CTC y CTC positivas a IGF-1R. Los paneles C y D representan dos pacientes en los que el número de CTC y CTC positivas a IGF-1R disminuyó tras la administración de cada dosis pero que volvió a recuperarse cada vez. Ambos pacientes se trataron con dosis bajas de anticuerpos anti-IGF-1R (0,8 y 3 mg/kg, respectivamente).

Los pacientes con HRPC que participaban en el Estudio 2, que tenían al menos una CTC detectable positiva a IGF-1R en el momento de la inscripción, tenían niveles más altos de PSA (n=10, PSA medio 475 ng/ml) que los que eran CTC negativos a IGF-1R (n=8, PSA medio 92 ng/ml). En dos pacientes no pudieron realizarse evaluaciones debido a la ausencia de muestras. A pesar de la apreciable carga tumoral más elevada, los pacientes que eran CTC positivos a IGF-1R en el momento de la inscripción respondieron, según criterio PSA, en una mayor proporción (6 de 10) y, en total, antes que los que fueron CTC negativos a IGF-1R (2 de 8) a la combinación de docetaxel y anticuerpos anti-IGF-1R, como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2

Pacientes con HRPC que responden al tratamiento	PSA inicial (ng/ml)	CTC Iniciales	CTC (+) IGF-1R Iniciales	Ciclo de Tratamiento de respuesta a PSA Inicial
1006	238	2	1	3°
1008	471	4	7	12°
1014	9944	12	5	2°
1019	617	44	19	3°
1022	1639	6	2	1°
1025	807	160	37	1°
1003	13	0	0	6°
1011	131	0	0	12°

De los ocho pacientes con HRPC en los que no se detectaron CTC al incorporarse al estudio, seis no respondieron al tratamiento, y tres de ellos experimentaron realmente un aumento en los recuentos de CTC y CTC positivas a IGF-1R en el momento de la progresión de la enfermedad. Finalmente, el único paciente con HRPC que se trató con docetaxel y anticuerpos anti-IGF-1R con CTC detectables, pero con CTC positivas a IGF-1R no detectables, no respondió al tratamiento combinado. El descenso en su recuento de CTC también fue pasajero (1 ciclo).

En la Tabla 3, se muestra un resumen de las mejores respuestas de los pacientes para los pacientes con HRPC del Estudio 2. Dos de ocho (25%) pacientes con CTC positivas a IGF-1R no detectables en 7.5 ml antes del inicio de la terapia mostraron una respuesta parcial a la terapia mientras que seis de once pacientes (55%) con ≥ 1 CTC positiva a IGF-1R en 7,5 ml mostraron una respuesta parcial. Estos datos apoyan con fuerza la idea de que el ensayo CTC-IGF-1R podría emplearse para identificar pacientes que pudieran beneficiarse con la terapia con anticuerpos anti-IGF-1R, así como para identificar la dosis óptima y determinar la duración del tratamiento.

Tabla 3
Células Tumorales Circulantes Positivas a IGF-1R y Pacientes con la Mejor Respuesta en el Estudio 2

Paciente	CTC (+) IGF-1R al inicio (n)	Mejor Respuesta
1001	2	PD
1005	2	SD
1006	1	PR
1008	1	PR
1012	31	PD
1013	4	PD
1014	5	PR
1019	19	PR
1021	4	PD
1022	2	PR
1025	37	PR
Total = 6 PR/11 pacientes		
Paciente	CTC (+) IGF-1R al inicio	Mejor Respuesta
1002	0	SD
1003	0	PR
1010	0	PD
1011	0	SD
1016	0	PD
1018	0	SD
1020	0	SD
Total = 2 PR/8 pacientes		
PD = enfermedad progresiva; SD = enfermedad estable; PR = respuesta parcial		

Ejemplo 4

Expresión del IGF-1R en las CTC en un estudio de anticuerpos anti-IGF-1R en combinación con Paclitaxel y Carboplatino

El Estudio 3 fue un estudio en fase 1b de anticuerpos anti-IGF-1R completamente humanos como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.037.498 en combinación con paclitaxel (TAXOL) y carboplatino (PARAPLATIN) en pacientes con tumores sólidos avanzados. La dosis de paclitaxel, carboplatino y anticuerpos anti-IGF-1R fue de 200 mg/m², AUC de 6, y 0,05-10 mg/kg, respectivamente. Para realizar el recuento de las CTC, cuarenta y un pacientes proporcionaron muestras de sangre. Las muestras de sangre se recogieron en cada Ciclo el día 1 previo a la dosis y el día 8.

Veintiuno de los cuarenta y un pacientes (51%) tenían una o más CTC en algún momento durante el estudio, mientras que diez de los cuarenta y un pacientes (24%) tenían una o más CTC antes de que se administrara la primera dosis. Dieciséis de los cuarenta y un pacientes (39%) tenían una o más CTC positivas a IGF-1R en algún momento durante el estudio, mientras que ocho de los cuarenta y un pacientes (20%) tenía una o más CTC positivas a IGF-1R antes de que se administrara la primera dosis. Un paciente con HRPC que participaba en el estudio tenía un gran número de CTC al incorporarse al estudio (71 CTC y 15 CTC positivas a IGF-1R) que descendió en respuesta al tratamiento (21 CTC y 2 CTC positivas a IGF-1R por tratamiento el día 21).

Los niveles de CTC y de CTC positivas a IGF-1R se representaron en relación al tiempo y se observaron diversos patrones de respuesta al tratamiento. En la FIG. 6 se representan cuatro ejemplos. El Panel A representa los datos de un paciente que se unió al estudio que tenía un número de CTC muy bajo. Tras 6 ciclos de tratamiento con paclitaxel/carboplatino y 0,05 mg/kg de anticuerpos anti-IGF-1R después de 2 ciclos más de 3 mg/kg de anticuerpos anti-IGF-1R, el paciente ya no respondió a la terapia. Esta falta de respuesta clínica se asoció a un aumento drástico del número de CTC y de CTC positivas a IGF-1R. La progresión de la enfermedad en este paciente se confirmó por tomografía computarizada, CT. En el Panel B se presentan los datos de un paciente con un patrón similar de aumento de CTC y de CTC positivas a IGF-1R durante el estudio. En los Paneles C y D se ilustran dos pacientes con CTC antes del inicio de la terapia. Los pacientes recibieron 1,5 y 6 mg/kg de anticuerpos anti-IGF-1R, respectivamente. El número de células positivas a IGF-1R parecía descender (Panel C) y permanecer bajo (Panel D) mientras el paciente estaba bajo tratamiento con anti IGF-1R. Estos datos refuerzan también un posible papel de los ensayos de CTC y CTC positivas a IGF-1R en el control del efecto y desarrollo de la resistencia al tratamiento con anticuerpos anti-IGF-1R.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la eficacia de una terapia con un antagonista del IGF-1R en un paciente, que comprende las etapas de: a) preparar una muestra en la que un espécimen biológico de un paciente se mezcla con un ligando que reacciona específicamente con células tumorales, para la exclusión sustancial de otros componentes de la muestra; b) poner en contacto la muestra con al menos un reactivo que se une específicamente a las células epiteliales; c) poner en contacto la muestra con un agente que tenga afinidad de unión por receptores del factor de crecimiento insulínico (IGF-1R) sobre las células; y d) analizar la muestra para determinar la presencia de células tumorales que expresen el IGF-1R, en el que el ligando es un anticuerpo que se une específicamente a una molécula de adhesión celular epitelial sobre la célula tumoral, en el que el reactivo es un anticuerpo marcado con FITC que reconoce citoqueratinas, en el que el agente es un anticuerpo marcado con PE, y en el que la presencia de células tumorales que expresan el IGF-1R en la muestra predice la eficacia de la terapia con un antagonista del IGF-1R en el paciente.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende la etapa de determinar el número de células tumorales que expresan el IGF-1R.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende la etapa de añadir a la muestra un colorante celular específico que permita excluir del análisis células residuales no nucleadas y restos celulares.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células tumorales marcadas se analizan al menos por un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en citometría de flujo multiparamétrica, microscopía inmunofluorescente, citometría de barrido por láser, análisis de imágenes en campo claro, volumetría capilar, análisis de formación de imágenes espectrales, análisis celular manual, análisis CELLSPOTTER, y análisis celular automático.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la muestra es una muestra inmunomagnética que comprende el espécimen biológico mezclado con partículas magnéticas acopladas al ligando, y adicionalmente comprende la etapa de someter la muestra inmunomagnética a un campo magnético, de tal manera que la muestra inmunomagnética se convierta en una suspensión enriquecida de células tumorales.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que las partículas magnéticas son coloidales.
7. Un procedimiento para controlar en un paciente la eficacia de una terapia con un antagonista de IGF-1R, que comprende las etapas de: a) preparar una primera muestra en la que un primer espécimen biológico de un paciente se mezcla con un ligando que reacciona específicamente con las células tumorales, para la exclusión sustancial de otros componentes de la muestra; b) poner en contacto la primera muestra con al menos un reactivo que se une específicamente a células epiteliales; c) poner en contacto la primera muestra con un agente que tenga afinidad de unión por los receptores del factor de crecimiento insulínico (IGF-1R) sobre las células; d) analizar la primera muestra para determinar la presencia y el número de células tumorales que expresan el IGF-1R; e) preparar una segunda muestra de un segundo espécimen biológico del paciente tras la administración de una terapia con un antagonista del IGF-1R, en el que el segundo espécimen biológico se mezcla con el ligando que reacciona específicamente con las células tumorales, y realizar las etapas b) - d) sobre la segunda muestra; y f) comparar el número de células tumorales que expresan el IGF-1R en la primera muestra con el número de células tumorales que expresan el IGF-1R en la segunda muestra, siendo un número inferior en la segunda muestra indicador de la eficacia de la terapia con un antagonista del IGF-1R en el paciente, en el que el ligando es un anticuerpo que se une específicamente a una molécula de adhesión celular epitelial sobre la célula tumoral, en el que el reactivo es un anticuerpo marcado con FITC que reconoce citoqueratinas, y en el que el agente es un anticuerpo marcado con PE.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que las células tumorales marcadas se analizan al menos por un proceso seleccionado del grupo que consiste en citometría de flujo multiparamétrica, microscopía inmunofluorescente, citometría de barrido por láser, análisis de imágenes en campo claro, volumetría capilar, análisis de formación de imágenes espectrales, análisis celular manual, análisis CELLSPOTTER, y análisis celular automático.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la muestra es una muestra inmunomagnética que comprende el espécimen biológico mezclado con partículas magnéticas acopladas al ligando, y adicionalmente comprende la etapa de someter la muestra inmunomagnética a un campo magnético, de tal manera que la muestra inmunomagnética se convierta en una suspensión enriquecida de células tumorales.
- 10.-El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las partículas magnéticas son coloidales.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la terapia con un antagonista del IGF-1R comprende un anticuerpo anti-IGF-1R.

FIG. 1

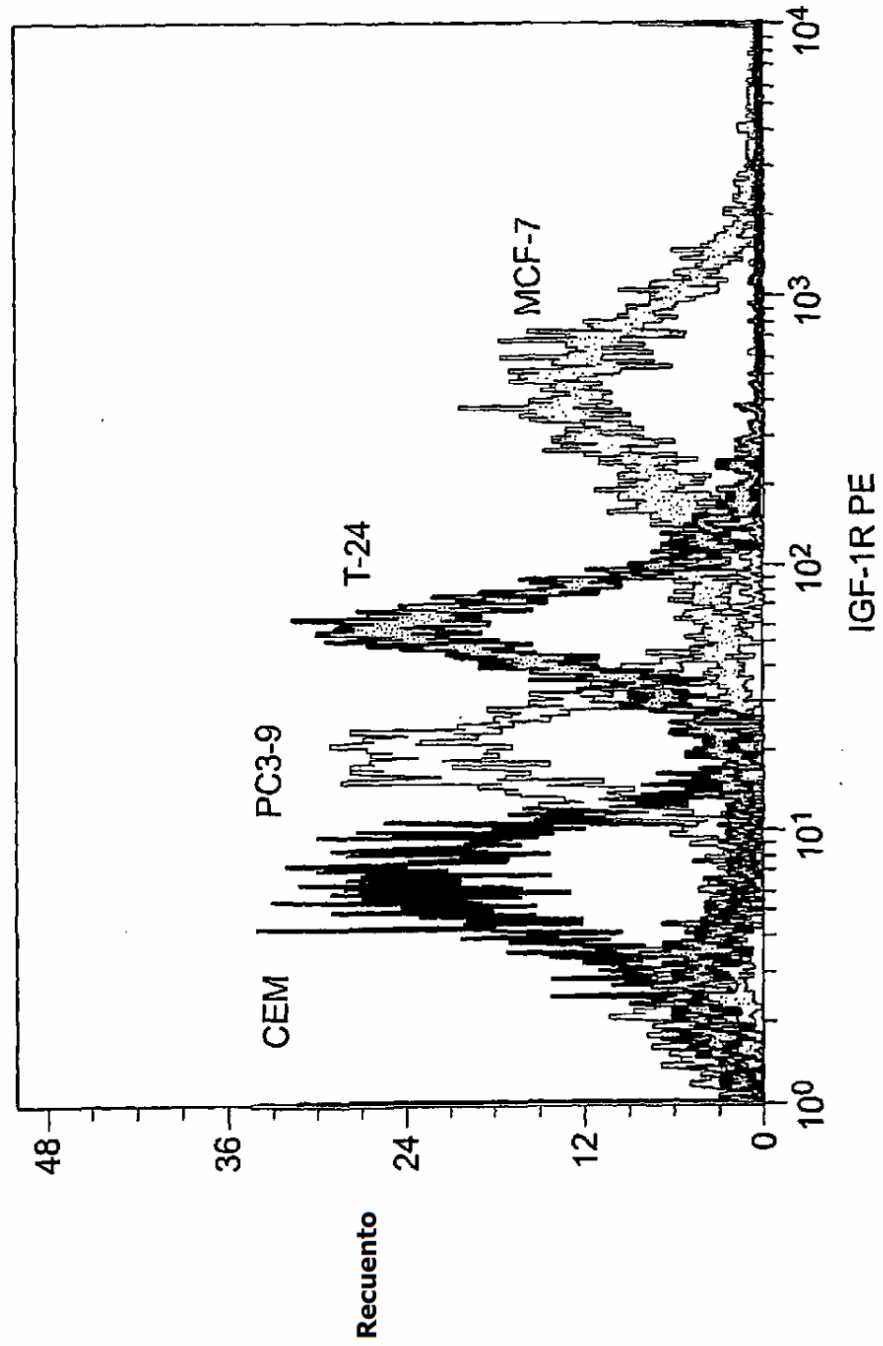


FIG. 2

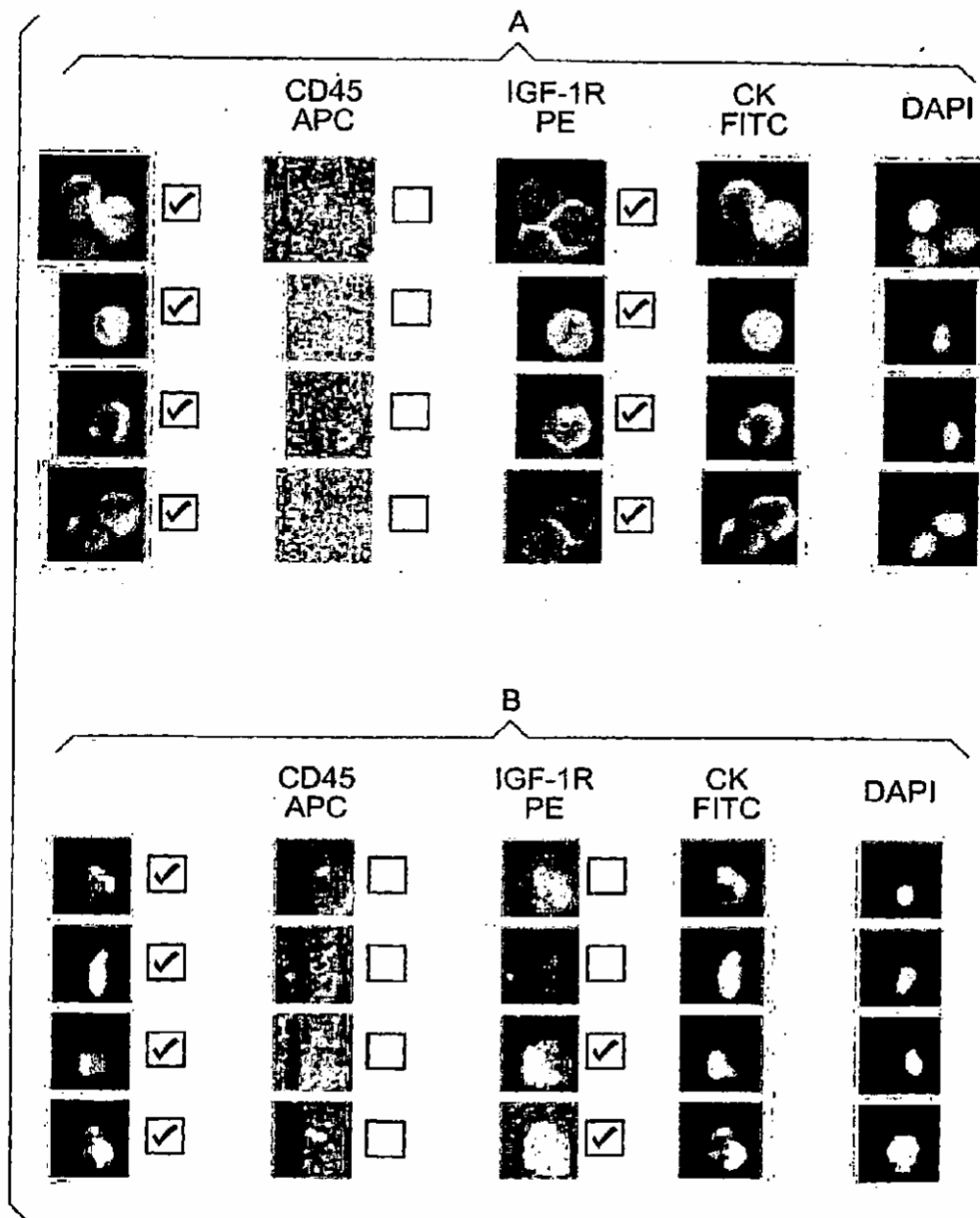


FIG. 3

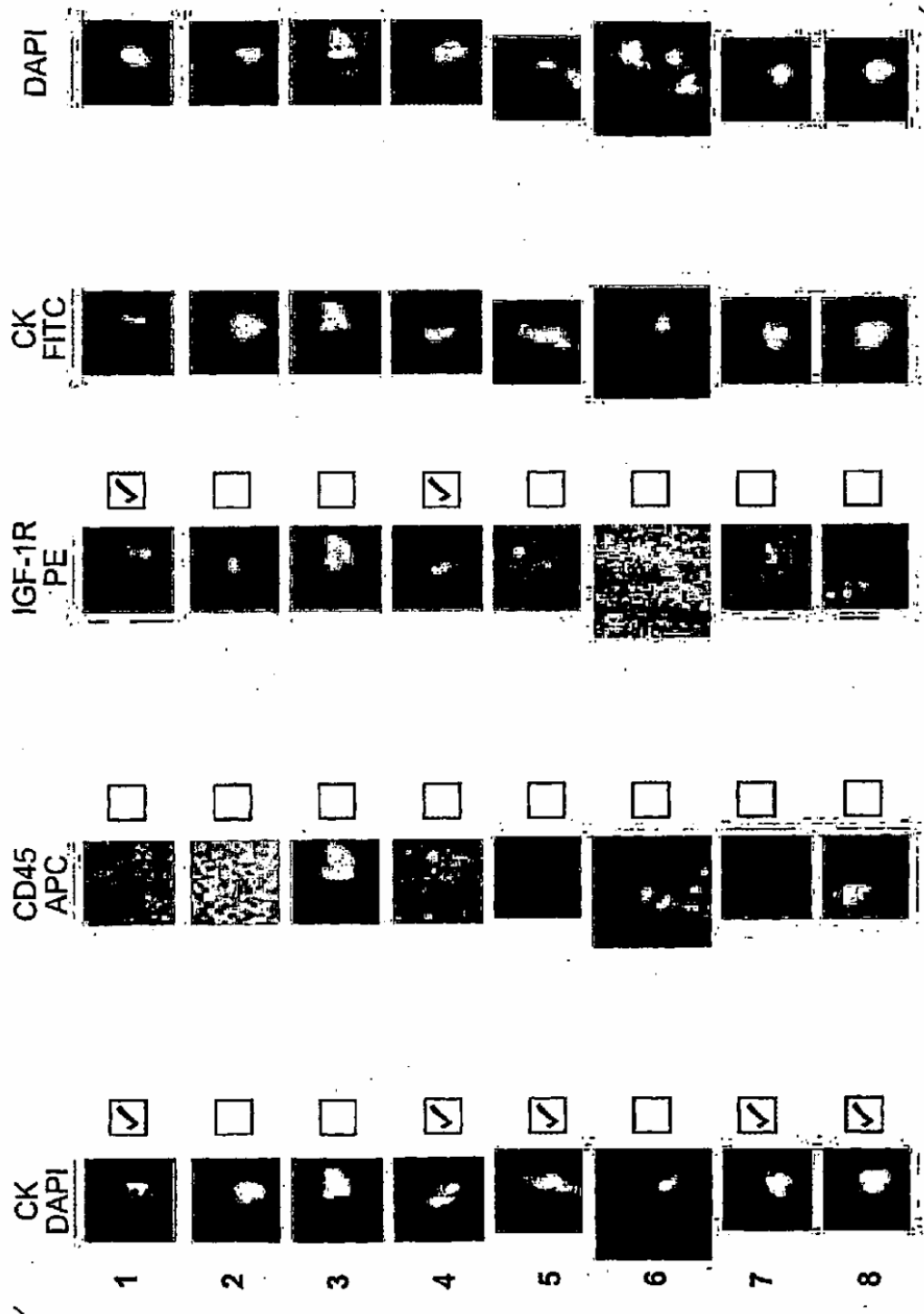


FIG. 4A

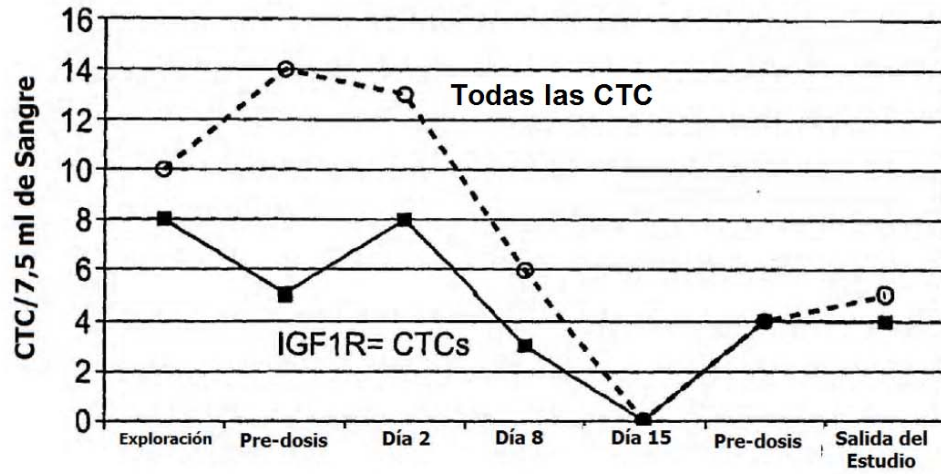


FIG. 4B

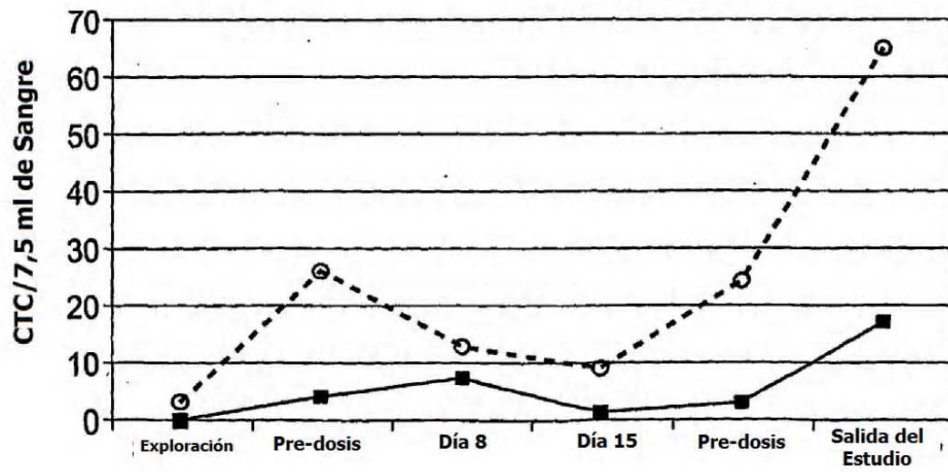


FIG. 4C

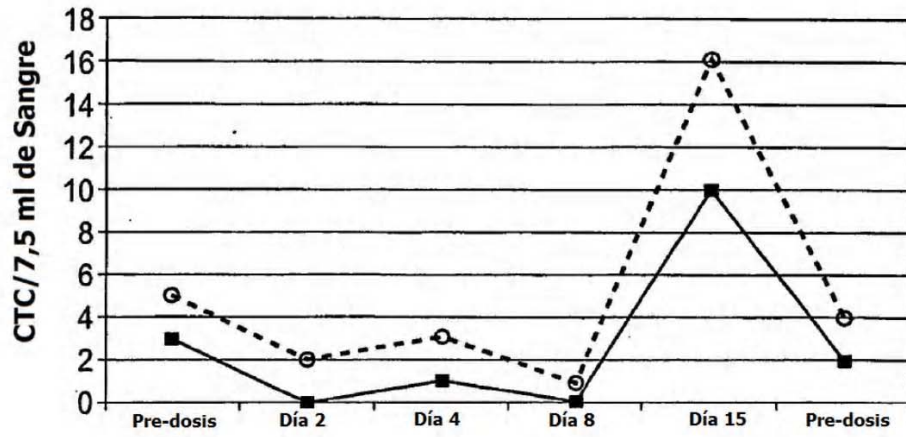


FIG. 4D

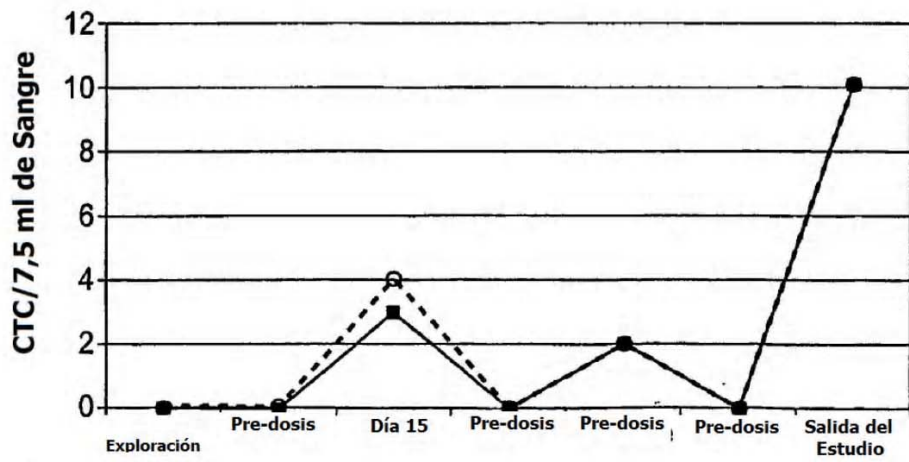


FIG. 5A

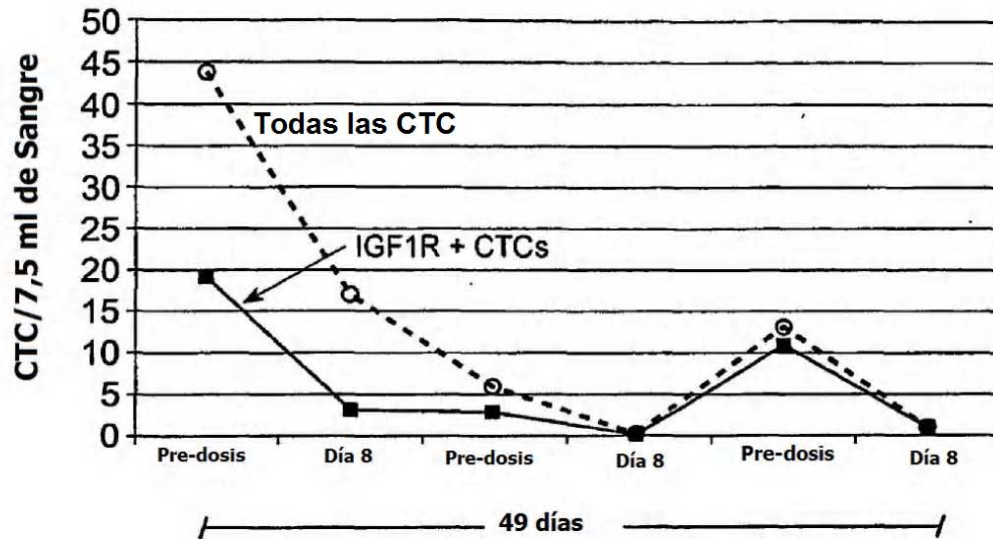


FIG. 5B

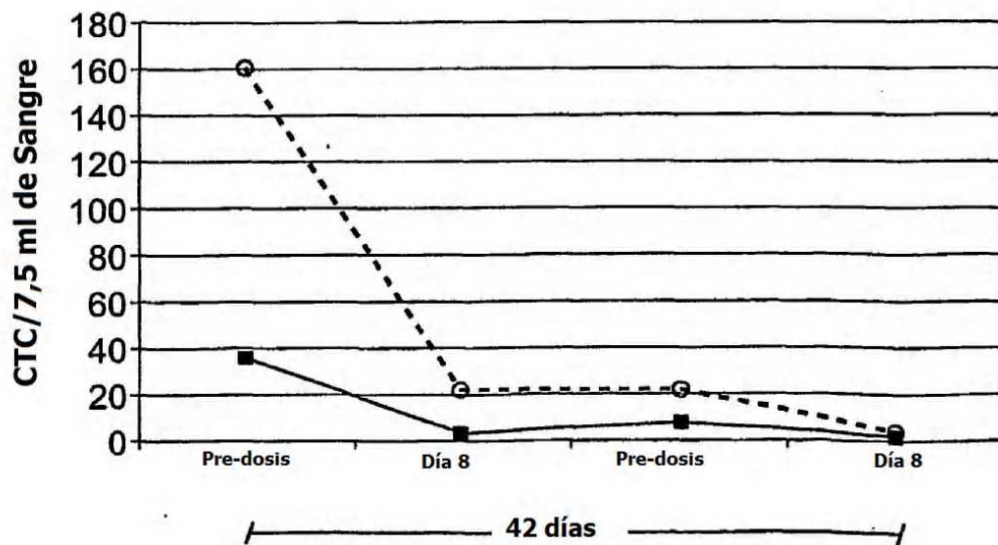


FIG. 5C

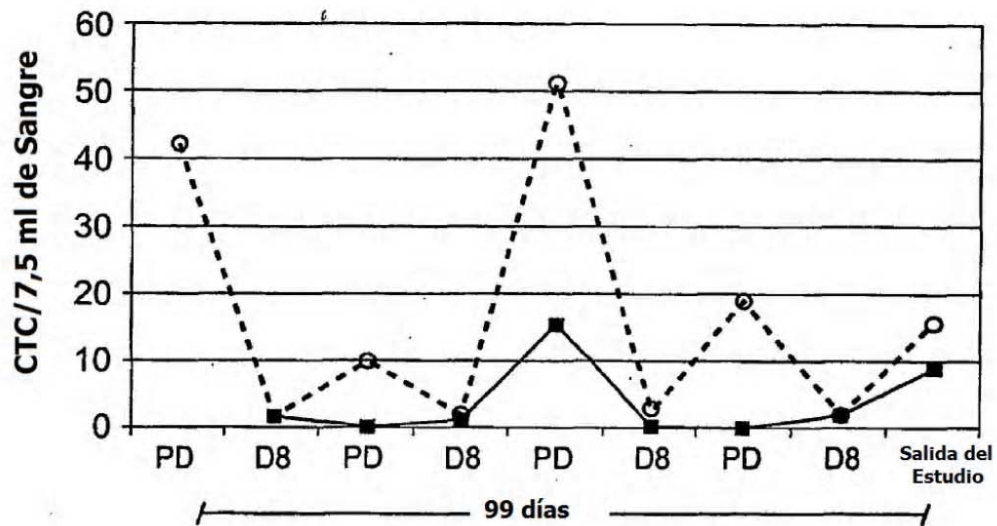


FIG. 5D

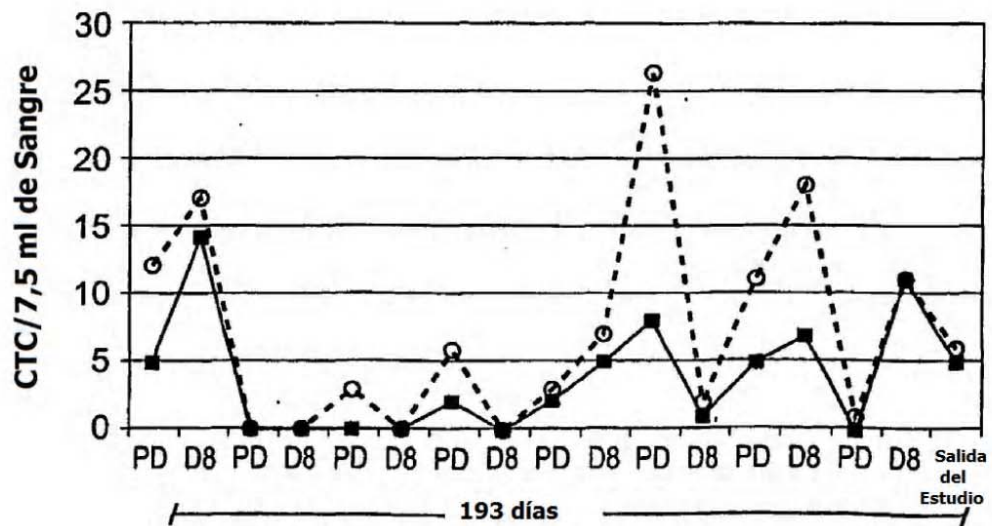


FIG. 6A

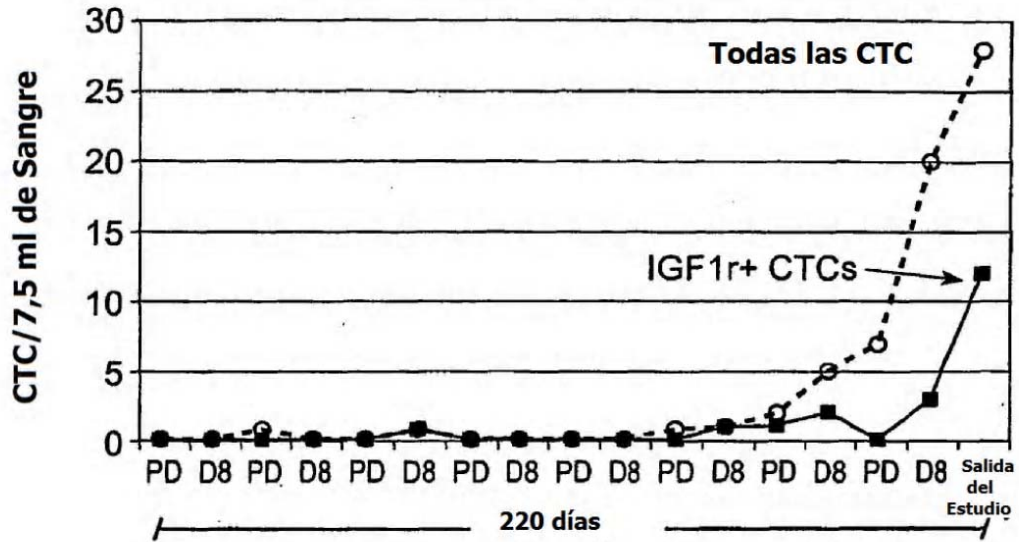


FIG. 6B

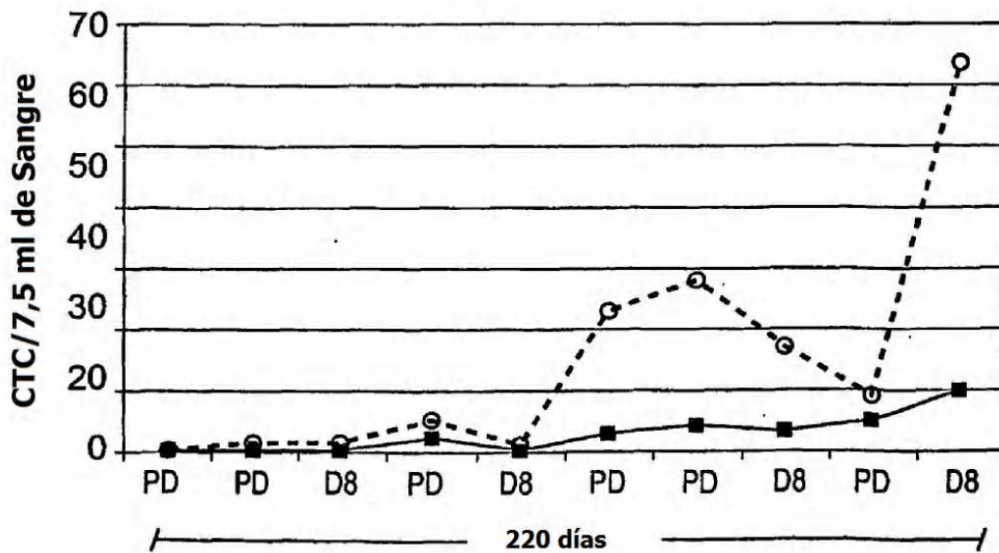


FIG. 6C

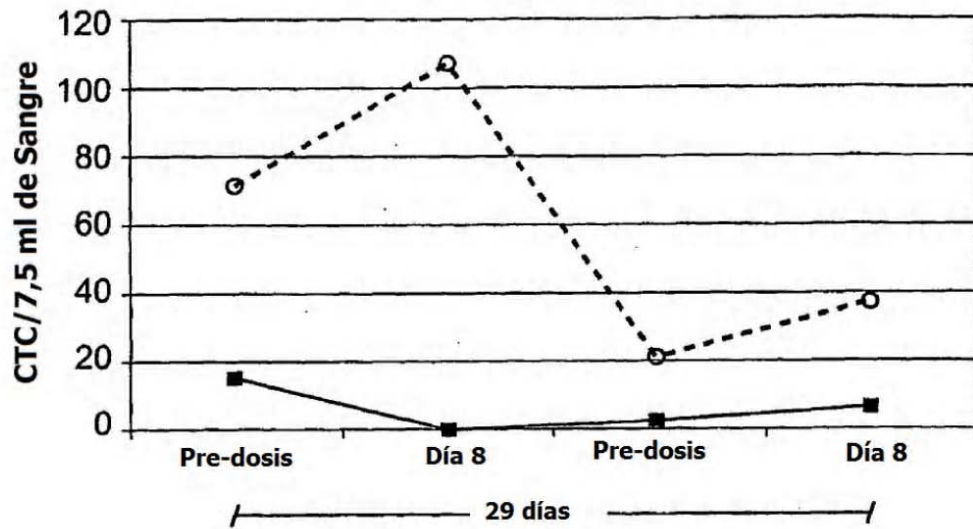


FIG. 6D

