

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 242**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2009 E 09814096 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2331145**

54 Título: **Método para determinar la eficacia antitumoral de anticuerpos monoclonales**

30 Prioridad:

**22.09.2008 EP 08016610**

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

**05.02.2015**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BOSSENMAIER, BIRGIT;  
LIFKE, VALERIA y  
SCHEUER, WERNER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 528 242 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 determinar la eficacia antitumoral de anticuerpos monoclonales

5 La presente invención se refiere a un método para determinar la eficacia antitumoral de anticuerpos monoclonales en ensayos preclínicos con roedores y a la utilización de dicho método para la reducción de ensayos complementarios.

10 Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales para el tratamiento terapéutico del cáncer se someten a un procedimiento de evaluación largo y costoso. Habitualmente se derivan mediante, por ejemplo, inmunización con el antígeno tumoral respectivo o fragmentos del mismo, lo que rinde hibridomas productores del anticuerpo monoclonal contra el antígeno tumoral. Antes de una evaluación intensiva posterior, debe llevarse a cabo un largo procedimiento de purificación, después del cual se evalúan en primer lugar *in vitro* y después en estudios animales preclínicos. En los estudios *in vitro* se determina principalmente su afinidad de unión al antígeno tumoral respectivo y la inhibición del crecimiento sobre células tumorales humanas, lo que es un requisito previo para los ensayos animales preclínicos. Sin embargo, se ha demostrado que la inhibición *in vitro* del crecimiento de células tumorales no siempre se correlaciona con la eficacia en los estudios animales *in vivo* de xenoinjertos. Se ha demostrado que los anticuerpos que presentan una buena actividad antiproliferativa *in vivo* pueden ser totalmente inactivos en el modelo preclínico *in vivo*, mientras que algunos anticuerpos inactivos *in vitro* pueden presentar una eficacia significativa *in vivo*. Por lo tanto, en general la experimentación animal preclínica para dichos anticuerpos es amplia y prolongada, y deben someterse a ensayo un gran número de anticuerpos diferentes por el pobre potencial predictivo de los estudios *in vitro*. Por lo tanto, una reducción de la experimentación animal preclínica además de menos procedimientos laboriosos es una tarea importante en el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra las enfermedades tumorales.

Staquet y Giles-Komar (Hybridoma 25:68-74, 2006) describen un método para la evaluación *in vivo* de los anticuerpos monoclonales. Inyectaron hibridomas en Matrigel por vía subcutánea en ratones. Cuatro días después se inyectaron por vía subcutánea células tumorales en los mismos ratones y se midió durante el tiempo el crecimiento tumoral. Un crecimiento tumoral reducido o la falta de crecimiento tumoral en comparación con los hibridomas de control indicaba la eficacia antiproliferativa de los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas respectivos. Con este método resulta posible distinguir los anticuerpos con actividad antitumoral de los anticuerpos sin actividad antitumoral. Sin embargo, dicho método proporciona posibilidades de diferenciación pobres o nulas para diferenciar entre el potencial antiproliferativo de los anticuerpos, los cuales todavía necesitan purificarse a partir de los hibridomas y someterse a ensayo nuevamente para evaluación adicional de su potencial antiproliferativo.

40 Descripción resumida de la invención

Un aspecto de la invención es un método para la determinación de la eficacia antitumoral de un anticuerpo monoclonal que comprende las etapas consecutivas de:

- a) aplicación de células tumorales a un roedor, en el que el roedor es un ratón o una rata,
- 45 b) medición del tamaño tumoral de dicho roedor en dependencia del tiempo hasta que el tamaño tumoral excede  $100 \text{ mm}^3$ ,
- c) aplicación de hibridomas productores de dicho anticuerpo monoclonal en dicho roedor, y
- d) medición del tamaño tumoral de dicho roedor portador tumoral en dependencia del tiempo.

50 El método según la invención es un procedimiento más rápido y eficiente para identificar, diferenciar y priorizar nuevos anticuerpos terapéuticos con eficacia antitumoral tras la inmunización en comparación con los ensayos convencionales y la priorización tras la purificación y preselección *in vitro*.

Otro aspecto de la invención es la utilización de dicho método para la reducción de la experimentación preclínica.

55 Descripción detallada de la invención

Una realización de la invención es un método para la determinación de la eficacia antitumoral de un anticuerpo monoclonal que comprende las etapas consecutivas de:

- a) aplicación de células tumorales a un roedor, en el que el roedor es un ratón o una rata,
- 60 b) medición del tamaño tumoral de dicho roedor en dependencia del tiempo hasta que el tamaño tumoral excede  $100 \text{ mm}^3$ ,
- c) aplicación de hibridomas productores de dicho anticuerpo monoclonal en dicho roedor, y
- d) medición del tamaño tumoral de dicho roedor portador tumoral en dependencia del tiempo.

En la etapa a), la aplicación preferentemente es una inyección subcutánea, ortotópica o intravenosa, más preferentemente una inyección subcutánea; las células tumorales son humanas; el roedor preferentemente es un ratón o rata, más preferentemente un ratón.

En la etapa b), se mide el tamaño tumoral hasta que el tamaño tumoral es de entre 100 mm<sup>3</sup> y 300 mm<sup>3</sup>.

En la etapa c), la aplicación preferentemente es una inyección subcutánea de los hibridomas en Matrigel o en fibras huecas, más preferentemente en Matrigel.

Opcionalmente, se añade una etapa adicional e) en la que se sacrifica el roedor y se investiga adicionalmente para efectos secundarios.

Dicho anticuerpo monoclonal producido por dichos hibridomas es un anticuerpo de unión a un antígeno tumoral que se expresa sobre la superficie celular de dichas células tumorales, que se utilizan en el método según la invención.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. Dichas moléculas son producidas por "hibridomas" tras la inmunización con los antígenos tumorales respectivos. El antígeno puede introducirse para la inmunización en, por ejemplo, un ratón o rata u otros animales mediante cualesquiera medios adecuados. Preferentemente, el animal se inmuniza por vía intraesplénica, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, por sí solo o en combinación con agentes inmunomoduladores apropiados (por ejemplo CFA). La dosis de cada antígeno preferentemente debe encontrarse comprendida en el intervalo de entre 1 y 500 mg. Los linfocitos de ratón resultantes pueden aislarse y fusionarse con una célula humana o de heteromioma utilizando PEG o electrofusión basada en protocolos estándares para generar hibridomas. La electrofusión se basa en un cambio estructural reversible de las membranas celulares que está causado por los efectos de un campo eléctrico y es aplicable a un amplio espectro de células para la fusión de dos o más células del mismo origen o de orígenes diferentes, incluyendo sus estructuras completas (núcleo, membranas, orgánulos y citoplasma) para crear una nueva célula viable. Lo anterior resulta en hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, los cuales resultan adecuados para el método según la invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "unión" o "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno tumoral en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo ELISA celular con células CHO que expresan antígeno de tipo salvaje. El término unión se refiere a una afinidad de unión ( $K_D$ ) de  $10^{-8}$  M o inferior, preferentemente de entre  $10^{-13}$  M y  $10^{-9}$  M. La unión del anticuerpo al antígeno puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión está definida por los términos  $k_a$  (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno),  $k_D$  (constante de disociación) y  $K_D$  ( $k_D/k_a$ ).

El método según la invención representa una mejora respecto a los ensayos convencionales de anticuerpos purificados, por varios motivos (ver también la Tabla 1): mediante priorización previamente a la purificación de los anticuerpos sólo se purifican los anticuerpos más eficaces, los hibridomas más interesantes, para la caracterización posterior, lo que implica una reducción significativa del número de purificaciones de anticuerpos, acelera el desarrollo de nuevos anticuerpos terapéuticos y reduce los esfuerzos generales de experimentación necesarios para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos (en comparación con el ensayo de muchos anticuerpos purificados). Además, los anticuerpos de hibridomas de baja producción, que con frecuencia se omiten en la evaluación posterior (la omisión se debe a su baja tasa de producción en los hibridomas, lo que dificulta obtener cantidades suficientes de anticuerpo purificado y no sus propiedades terapéuticas), se encuentran más fácilmente disponibles para la evaluación de sus propiedades terapéuticas.

Tabla 1: Comparación entre la tecnología convencional y la nueva tecnología de hibridomas

	<b>Tecnología convencional</b>	<b>Nueva tecnología de hibridomas</b>
Esfuerzo de tiempo para el cultivo de hibridomas <i>in vitro</i>	dos a tres semanas	no necesario
Esfuerzo de tiempo para la purificación y la cuantificación de mAb a partir de sobrenadantes de hibridoma	una semana	no necesario
Esfuerzo de tiempo para ensayos <i>in vitro</i> (proliferación 2D y 3D, FACS, BiaCore)	una a dos semanas	no necesario

Correlación entre las funciones efectoras <i>in vitro</i> y la actividad terapéutica <i>in vivo</i>	limitada *	-
Correlación entre la eficacia terapéutica del hibridoma y la eficacia del mAb purificado	-	alto
Funcionalidad de las interacciones célula tumoral-célula estromal	limitada **	obtenida
Aspectos farmacocinéticos	no posible	sí
Número de ratones para el estudio preclínico de eficacia	10 para un mAb y una dosis en múltiples aplicaciones	5 para un hibridoma sin aplicaciones
costes	100%	20%
potencial de optimización	difícil	sí
* existen ejemplos en los que los mAb presentaban una actividad marginal sobre la proliferación <i>in vitro</i> , aunque una convincente actividad <i>in vivo</i>		
** el cocultivo 3D resulta posible, aunque todavía no presenta un adecuado reflejo sobre la situación <i>in vivo</i>		

Un aspecto adicional de la invención es un método para la reducción de la experimentación preclínica en animales roedores, caracterizado por:

- 5 a) la utilización para la evaluación de la eficacia antitumoral de anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas, dicho método para la determinación de la eficacia antitumoral de un anticuerpo monoclonal indicado anteriormente, y  
 b) la priorización de uno a tres anticuerpos monoclonales, preferentemente un anticuerpo monoclonal, para la evaluación preclínica adicional.

- 10 Dicha evaluación preclínica adicional puede llevarse a cabo en los mismos o en otros ensayos preclínicos con animales. Mediante la utilización de dicho método de priorización temprana sólo se requiere la evaluación de un número reducido de candidatos a fármaco de anticuerpo monoclonal en ensayos preclínicos animales adicionales en lugar de la experimentación de un amplio espectro de anticuerpos purificados de manera extensiva en ensayos preclínicos animales. De esta manera, puede conseguirse hasta un 50% de reducción de los ensayos preclínicos animales en roedores.
- 15

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

20 Descripción de las figuras

- Figura 1 Efecto de hibridomas productores de anticuerpos sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de Calu-3 aplicando el método según **Staquet et al.** (Ejemplo 1).
- Figura 2 Efecto de hibridomas productores de anticuerpos sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de Calu-3 en el nuevo método según la invención (Ejemplo 2).
- Figura 3 Efecto de los anticuerpos purificados sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de Calu-3 en el nuevo método según la invención (Ejemplo 3).

**Ejemplo 1**

- 25 Efecto de los hibridomas productores de anticuerpos anti-HER3 en un xenoinjerto de tumor pulmonar humano (método de Staquet et al.)

30 Basándose en el método publicado por Staquet y Giles-Komar, se inyectaron en ratones BALB/c desnudos hembra cuatro hibridomas diferentes que producían anticuerpos contra HER3. Se mezclaron los hibridomas ( $5 \times 10^5$ ) con 100 microlitros de Matrigel a 4°C y se inyectaron inmediatamente por vía subcutánea en la zona del hombro. A modo de control se utilizaron células Ag8. Una semana después se inyectaron por vía subcutánea en el hombro opuesto células tumorales Calu-3 ( $5 \times 10^6$ /100 microlitros), las cuales expresan el antígeno Her3 sobre la superficie celular. A continuación se llevó a cabo un seguimiento del volumen tumoral con un calibrador durante los diez días siguientes.

La fig. 1 indica que los anticuerpos secretados de los hibridomas suprimen el crecimiento tumoral. Sin embargo, basándose en los volúmenes tumorales, no se observó diferenciación y por lo tanto no pudo realizarse ninguna priorización de los diferentes hibridomas con respecto a la eficacia antitumoral.

## 5 Ejemplo 2

Efecto de los hibridomas productores de anticuerpos anti-HER3 en un xenoinjerto de tumor pulmonar humano (nuevo método optimizado)

10 Se inyectaron por vía subcutánea en ratones Balb/c desnudos hembra células tumorales Calu-3 ( $5 \times 10^6/100$  microlitros). Tras 44 días, se aleatorizaron los ratones portadores tumorales y se dividieron en diferentes grupos. La media de volumen tumoral era de  $130 \text{ mm}^3$ . En contraste con el método descrito por Staquet y Giles-Komar, los hibridomas productores de anticuerpos anti-Her3 se mezclaron con Matrigel y se inyectaron por vía subcutánea en un sitio opuesto al sitio de inyección de células tumorales. Además, en el presente experimento se incluyeron dos  
15 hibridomas (clones 31 y 33). Nuevamente como control de hibridoma se utilizaron células Ag8.

La fig. 2 demuestra que 23 días después de la inyección de los hibridomas, los clones 33, 12 y 29 indujeron la eficacia antitumoral más potente. En contraste, los clones 18, 30 y 31 no ejercieron ningún efecto sobre el crecimiento de los tumores y tal como se esperaba el hibridoma Ag8 no presentó eficacia. El presente método  
20 optimizado permite seleccionar diferentes hibridomas con respecto a su eficacia antitumoral.

La comparación entre las figs. 1 y 2 demuestra que la nueva técnica es superior al método descrito por Staquet y Giles-Komar. La presente solicitud describe la inyección de hibridomas en ratones portadores de tumores establecidos y, por lo tanto, pueden extraerse conclusiones con respecto a la eficacia de los anticuerpos secretados  
25 por los hibridomas que reflejan más adecuadamente la situación clínica.

## Ejemplo 3

30 Evaluación de la eficacia antitumoral de anticuerpos purificados a partir de sobrenadantes de hibridoma en un xenoinjerto de tumor pulmonar humano

El presente ejemplo describe el enfoque convencional al desarrollo de anticuerpos terapéuticos y apoya los resultados del experimento descrito en el Ejemplo 2.

35 Se purificaron anticuerpos contra el antígeno Her3 a partir de los sobrenadantes de seis hibridomas diferentes. Se sometieron a ensayo estos anticuerpos para la actividad antitumoral en un xenoinjerto relevante.

Se inyectaron por vía subcutánea en ratones Balb/c desnudos hembra células tumorales Calu-3 ( $5 \times 10^6/100$  microlitros). Tras 35 días, se aleatorizaron los ratones portadores tumorales y se dividieron en diferentes grupos. La  
40 media de volumen tumoral era de  $80 \text{ mm}^3$ . Los ratones fueron tratados mediante inyección i.p. con diferentes anticuerpos una vez a la semana durante 5 semanas. Se realizó un seguimiento del volumen tumoral dos veces a la semana con un calibrador durante la totalidad del periodo de estudio. Los anticuerpos derivados del clon 12 (inhibición del crecimiento tumoral: 66%), los anticuerpos purificados a partir del clon 33 (inhibición del crecimiento tumoral: 50%) y los anticuerpos procedentes del clon 29 (inhibición del crecimiento tumoral: 47%) fueron  
45 identificados como los más eficaces en la supresión del crecimiento tumoral. En contraste, los anticuerpos purificados a partir de los clones 18, 30 y 31 resultaron ineficaces (fig. 3).

La comparación entre la figs. 2 y 3 demuestra que los hibridomas que han sido inyectados en ratones con tumores establecidos ejercieron una actividad antitumoral comparable a la eficacia terapéutica de anticuerpos purificados a partir de los sobrenadantes de los hibridomas relevantes.  
50

Además, para los hibridomas que resultaron ineficaces, los anticuerpos purificados a partir de dichos hibridomas no redujeron el crecimiento tumoral. Estos resultados demuestran la validez del método mejorado.

55 Lo anterior implica una clara reducción del esfuerzo experimental necesario para la evaluación de los anticuerpos terapéuticos, ya que la purificación ya no resulta necesaria para la evaluación y la priorización.

**REIVINDICACIONES**

1 .Método para la determinación de la eficacia antitumoral de un anticuerpo monoclonal, que comprende las etapas consecutivas de:

5 a) aplicación de células tumorales en un roedor, en la que el roedor es un ratón o una rata, b) medición del tamaño tumoral de dicho roedor en dependencia del tiempo hasta que el tamaño tumoral excede 100 mm<sup>3</sup>, c) aplicación de hibridomas productores de dicho anticuerpo monoclonal en dicho roedor, y d) medición del tamaño tumoral en dicho roedor portador tumoral en dependencia del tiempo

10 en el que el método se utiliza para priorizar anticuerpos terapéuticos con eficacia antitumoral tras la inmunización.

2. Método para la reducción de la experimentación preclínica en animales roedores, caracterizado por:

15 a) la utilización para la evaluación de la eficacia antitumoral de anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas, del método según la reivindicación 1, y  
b) la priorización de uno a tres anticuerpos monoclonales, preferentemente un anticuerpo monoclonal, para la evaluación preclínica adicional.

Fig. 1

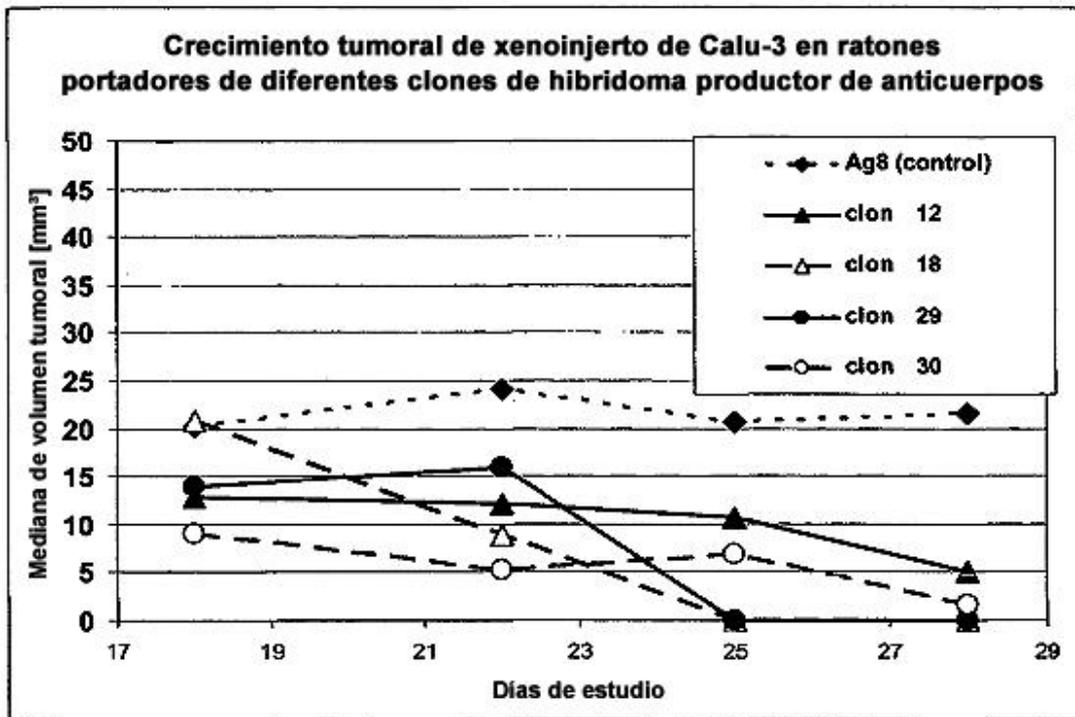
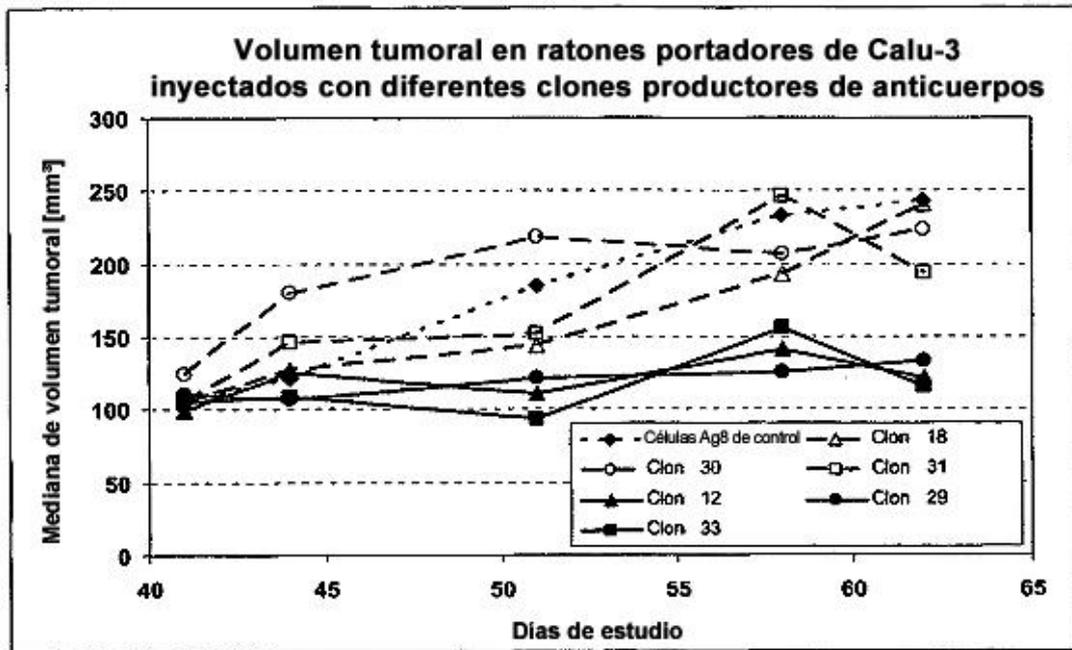


Fig. 2



**Fig.3**

