

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 784**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008 E 08759012 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2155786**

54 Título: **Composición de un primer anticuerpo monoclonal no marcado, que se une a un antígeno de tumor y un segundo anticuerpo monoclonal que no tiene reacción cruzada y está marcado con un marcador de fluorescencia NIR**

30 Prioridad:

06.06.2007 EP 07011087

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

08.01.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HASMANN, MAX;
LENZ, HELMUT y
SCHEUER, WERNER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 555 784 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

Composición de un primer anticuerpo monoclonal no marcado, que se une a un antígeno de tumor y un segundo anticuerpo monoclonal que no tiene reacción cruzada y está marcado con un marcador de fluorescencia NIR

Esta invención se refiere a una composición de un anticuerpo monoclonal no marcado, que se une a un antígeno tumoral y un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une al mismo antígeno tumoral, dichos anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada. La composición puede emplearse para el tratamiento de pacientes que padecen tumores sólidos asociados con una expresión excesiva de dicho antígeno tumoral. La invención se refiere además a la co-administración de dichos anticuerpos primero y segundo así como a un método para obtener imágenes de fluorescencia NIR de dichos tumores o de pacientes que padecen tales tumores durante el tratamiento con dicha composición o la co-administración de tales anticuerpos.

Antecedentes de la invención

Anticuerpos monoclonales para la terapia

En la búsqueda que está en curso para mejorar el arsenal terapéutico contra el cáncer ha surgido una cuarta arma distinta de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, a saber, la terapia dirigida. La terapia dirigida incluye a los inhibidores de receptores de la tirosina-quinasa (inhibidores de molécula pequeña de tipo imatinib, gefitinib y erlotinib), los inhibidores de proteasoma (bortezomib), los modificadores de respuesta biológica (denileukin diftitox) y los anticuerpos monoclonales (MAbs). La notable especificidad de los MAbs como terapia dirigida lo convierte en agentes prometedores para la terapia humana. Los MAbs pueden emplearse no solo para proteger terapéuticamente contra enfermedades, sino que pueden emplearse también para el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades, para la medición de los niveles de proteínas y de fármacos en el suero, en tejidos tipo y en la sangre y para identificar los agentes infecciosos y las células específicas que intervienen en la respuesta inmune. Aproximadamente un cuarto de todos los fármacos biotecnológicos en desarrollo son MAbs y unos 30 productos se están empleando ya o son objeto de investigación. Un gran número de MAbs se emplean para el tratamiento del cáncer (Gupta, N. y col., *Indian Journal of Pharmacology* 38, 390-396, 2006; Funaro, A. y col., *Biotechnology Advances* 18, 385-401, 2000; Suemitsu, N. y col., *Immunology Frontier* 9, 231-236, 1999).

Anticuerpos monoclonales marcados y generación de imágenes "in vivo"

Se dispone de varios métodos de generación de imágenes "in vivo" para la cuantificación de anticuerpos terapéuticos en el tejido tumoral, que se basan normalmente en derivados marcados de los anticuerpos. Dichos anticuerpos marcados incluyen por lo general anticuerpos marcados con radiomarcadores, p. ej. el I^{124} , el In^{111} , el Cu^{64} y otros, que se emplean en la tomografía de emisión de positrones (PET) (véase p. ej. Robinson, M.K. y col., *Cancer Res.* 65, 1471-1478, 2005; Lawrentschuk, N. y col., *BJU International* 97, 916-922, 2006; Olafsen, T. y col., *Cancer Research* 65, 5907-5916, 2005; y Trotter, D.E. y col., *Journal of Nuclear Medicine* 45, 1237-1244, 2004), el I^{123} , el I^{125} y el Tc^{99m} y otros, que se emplean en la tomografía computerizada de emisión de fotones individuales (SPECT) (véase p. ej. Orlova, A. y col., *Journal of Nuclear Medicine* 47, 512-519, 2006; Dietlein, M. y col., *European Journal of Haematology* 74, 348-352, 2005).

Se conocen también marcadores no radiactivos para las técnicas de generación de imágenes "in vivo", marcadores de fluorescencia en la región infrarroja próxima (near-infrared, NIR), colorantes activables y grupos informantes (reporter) endógenos (proteínas fluorescentes como son las proteínas de tipo GFP y la formación de imágenes bioluminiscentes) (Licha, K. y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1087-1108, 2005). En especial la formación de imágenes de fluorescencia NIR puede emplearse para la cuantificación de anticuerpos terapéuticos en tejidos tumorales. Las ventajas de la formación de imágenes en la región infrarroja próxima con respecto a otras técnicas de generación de imágenes clínicas empleadas en la actualidad incluyen las siguientes: la posibilidad de empleo simultáneo de sondas múltiples distinguibles (importante en la formación de imágenes a nivel molecular); la elevada resolución temporal (importante en la formación de imágenes funcionales); la elevada resolución espacial (importante para la microscopía "in vivo"); y la seguridad (no se emplea radiación ionizante).

Existen diferentes anticuerpos monoclonales unidos mediante enlace covalente a un marcador de fluorescencia NIR (Hilger, I. y col., *Eur. Radiol.* 1124-1129, (2004); Ballou, B. y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 41 (4), 257-63, 1995; Ballou, B. y col., *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering* 2680, 124-131, 1996; Ballou, B. y col., *Biotechnol. Prog.* 649-58, (1997); Ballou, B. y col., *Cancer detection and prevention* (1998), 22 251-257 Becker, A. y col., *Nature Biotechnology* 19, 127-131, 2001; Montet, X. y col., *Cancer Research* 65, 6330-6336, 2005; Rosenthal, E.L. y col., *The Laryngoscope* 116, 1636-1641, 2006; EP 1619501, WO 2006/072580, WO 2004/065491 y WO 2001/023005), que se emplean como agentes individuales para la formación de imágenes por fluorescencia NIR.

En la formación de imágenes de fluorescencia NIR se emplea como fuente de luz de excitación una luz filtrada o un láser de ancho de banda definido. La luz de excitación viaja a través de los tejidos del cuerpo. Cuando incide sobre

una molécula fluorescente en el infrarrojo próximo (“agente de contraste”), entonces se absorbe dicha luz de excitación.

5 La molécula fluorescente emite entonces una luz (fluorescencia) que puede diferenciarse espectralmente (longitud de onda ligeramente más larga) de la luz de excitación. A pesar de la buena penetración de la luz infrarroja próxima en los tejidos biológicos, las sondas convencionales de fluorescencia infrarroja próxima están sometidas a muchas de las limitaciones que se han observado ya en otros agentes de contraste, incluidas las proporciones bajas entre dianas y fondos.

10 Las longitudes de ondas infrarrojas próximas (aproximadamente 640-1300 nm) se han empleado para la generación de imágenes ópticas de tejidos internos, porque la radiación infrarroja próxima presenta una penetración en los tejidos de hasta 6-8 centímetros, véase, p. ej., Wyatt, J.S. y Kirkpatrick, P.J., Phil. Trans. R. Soc. B 352, 701-705, 1997; Tromberg y col., Phil. Trans. R. Soc. B Londres 352, 661-667, 1997.

15 Las cantidades exactas de los conjugados anticuerpo-marcador empleados para la generación de imágenes “in vivo” depende de las diferentes características y aspectos de los marcadores empleados, p. ej. en el caso de los marcadores de fluorescencia NIR el rendimiento cuántico del marcador es uno de los criterios exigidos para la cantidad de marcador o de anticuerpo marcado empleados (véase p. ej. WO 2006/072580).

20 Seguimiento de la terapia durante el tratamiento con anticuerpos monoclonales

25 Los factores que influyen en el éxito de la terapia contra enfermedades malignas incluyen la dosis empleada de anticuerpo y el régimen de administración, la vida media y la eliminación rápida de los anticuerpos de la sangre, la presencia de antígeno circulante, la escasa penetración del anticuerpo monoclonal (MAb) de peso molecular elevado en el tumor y la vía en que se catabolizan estas moléculas. En el momento presente existe una falta de conocimientos sobre muchos aspectos de la función fisiológica y del metabolismo de los anticuerpos (Iznaga-Escobar, N. y col., Meth. Find. Exp. Clin. Pharm. 26 (2), 123-127, 2004). Por ello es importante hacer el seguimiento del curso de dichas terapias.

30 El éxito de tales tratamientos se evalúa por lo general mediante diferentes técnicas de formación de imágenes, por ejemplo la radiografía de tórax, la tomografía computerizada (CT), la tomografía axial computerizada (CAT), la generación de imágenes por resonancia molecular (MRI), la tomografía de emisión de positrones (PET), la tomografía computerizada de emisión de fotones individuales (SPECT), la formación de imágenes de fluorescencia (FI) y la generación de imágenes bioluminiscentes (BLI) (véase p. ej. Helms, M.W. y col., Contributions to microbiology 13, 209-231, 2006 y Pantel, K. y col., JNCI 91, 1113-1124, 1999). A menudo se define como la “respuesta” al tratamiento. Con arreglo a los criterios RECIST, la respuesta a los tumores sólidos (Therasse y col., J. Nat. Cancer Institute 92, 205-216, 2000) se clasifica en función de la progresión o regresión del volumen de dichos tumores (p. ej. medido por CT) en cuatro niveles: respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD) y enfermedad progresiva (PD) (ver tabla 1). Además, la Organización Europea de Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC) propone la categorización de cuatro niveles en función del metabolismo de los tumores medido por tomografía de emisión de positrones de 2-fluor[F¹⁸]-2-dedoxiglucosa (FDG-PET) (Young, H. y col., Eur. J. Canc. 35, 1773-1782, 1999 y Kelloff, G.J. y col., Clin. Canc. Res. 11, 2785-2808, 2005): respuesta metabólica completa (CMR) o respuesta metabólica parcial (PMR), enfermedad metabólica estable (SMD) y enfermedad metabólica progresiva (PMD) (ver tabla 2). En fechas recientes se está generalizando cada vez la evaluación combinada de CT y PET. La CT se centra principalmente en el desarrollo del tamaño del tumor, proporciona solo una información restringida del metabolismo del tumor y se asocia con la exposición a la radiación radiactiva, mientras que la generación de imágenes PET facilita una visión más profunda del metabolismo del tumor, pero para esta técnica se requieren todavía marcadores radiactivos.

50 Resumen de la invención

La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene:

55 a) un anticuerpo monoclonal no marcado que se une a un antígeno tumoral y
b) un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral,

60 caracterizada porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Dicha composición puede estar formada por un compartimento que contenga los dos anticuerpos o por dos compartimentos, uno de ellos contiene el anticuerpo monoclonal no marcado y uno contiene el anticuerpo monoclonal marcado.

65 El anticuerpo monoclonal no marcado es con preferencia un anticuerpo anti-HER2, con preferencia el trastuzumab o el pertuzumab.

En otra forma preferida de ejecución, el anticuerpo monoclonal no marcado es un anticuerpo anti-EGFR, con preferencia el caetuximab o el rhMab ICR62.

5 Una forma de ejecución de la invención consiste en el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido, que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, en el que el anticuerpo monoclonal no marcado se co-administra con un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

15 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado, que se une de modo específico a un antígeno tumoral, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido, que expresa en exceso dicho antígeno tumoral tratado previamente con dicho anticuerpo monoclonal no marcado y un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, en tal caso después del dicho tratamiento previo la señal de fluorescencia en una región del tumor sólido ha disminuido por lo menos en un 10%, con preferencia por lo menos en un 20%, con mayor preferencia por lo menos en un 30%, comparada con la señal de fluorescencia NIR en dicha región del tumor sólido antes de dicho tratamiento previo con dicho anticuerpo monoclonal no marcado; caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

20 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, en el que el régimen de administración del medicamento consta de los pasos siguientes:

- a) el paciente recibe una primera dosis de un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral;
- 30 b) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en una región del tumor sólido;
- c) el paciente recibe una primera dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado;
- d) el paciente recibe una segunda dosis de dicho segundo anticuerpo marcado con un marcador de fluorescencia NIR;
- 35 e) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en dicha región del tumor sólido y ha disminuido por lo menos en un 10%, con preferencia por lo menos en un 20%, con mayor preferencia por lo menos en un 30%, comparada con la señal medida en el apartado b);
- f) el paciente recibe una segunda dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado en base al resultado de la medición realizada en el paso e);

40 caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

45 Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral.

50 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un tumor sólido, en el que, durante dicho tratamiento y para realizar el seguimiento del mismo se emplea un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

55 Se describe también un método para obtener una imagen de fluorescencia NIR de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso a antígeno tumoral, que haya recibido una dosis de un primer anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a dicho antígeno tumoral y una dosis de un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, en el que se mide la señal de fluorescencia NIR de una región del tumor sólido, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

60 Otro aspecto de la invención es un método no invasivo de obtención de una imagen de fluorescencia NIR, en el que se mide la señal de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a un antígeno tumoral, en una región de un tumor sólido durante el tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso un antígeno tumoral con un anticuerpo monoclonal que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

65

Se describe también un método para determinar la señal de fluorescencia NIR de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a un antígeno tumoral, en una región del tumor sólido durante el tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso un antígeno tumoral con un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, en el que se llevan a cabo los pasos siguientes:

- a) el paciente recibe una primera dosis de un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, dichos anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada;
- b) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en una región del tumor sólido;
- c) el paciente recibe una primera dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado;
- d) el paciente recibe una segunda dosis de dicho segundo anticuerpo marcado con un marcador de fluorescencia NIR;
- e) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en dicha región del tumor sólido y ha disminuido por lo menos en un 10%, con preferencia por lo menos en un 20%, con mayor preferencia por lo menos en un 30%, comparada con la señal medida en el apartado b);
- f) el paciente recibe una segunda dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado en base al resultado de la medición realizada en el paso e);

caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Descripción detallada de la invención

El término “anticuerpo” abarca las diversas formas de anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos enteros, los anticuerpos humanos, los anticuerpos humanizados y los anticuerpos de ingeniería genética, por ejemplo los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos quiméricos o los anticuerpos recombinantes así como los fragmentos de tales anticuerpos en el supuesto de que se mantengan las propiedades características de la invención.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” se emplea aquí para indicar una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos. Por lo tanto, el término “anticuerpo monoclonal humano” indica los anticuerpos que presentan una sola especificidad de unión, que tienen regiones variables y constantes derivadas de la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una forma de ejecución, los anticuerpos monoclonales humanos se producen con un hibridoma, que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, p. ej. de un ratón transgénico, que tiene un genoma, que comprende un transgén de cadena larga humanos y un transgén de cadena corta humano fusionados en una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo quimérico” indica un anticuerpo monoclonal que contiene una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, que se prepara por lo general mediante técnicas de DNA recombinante. Son preferidos en especial los anticuerpos quiméricos que contienen una región variable murina y una región constante humana. Tales anticuerpo quiméricos murino/humanos son el producto de los genes de inmunoglobulina expresados, que contienen segmentos de DNA que codifican a las regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de DNA que codifican a las regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de “anticuerpos quiméricos” abarcados por la presente invención son aquellos, en los que la clase o la subclase se ha modificado o se ha cambiado con respecto al anticuerpo original. Tales anticuerpos “quiméricos” son se denominan también “anticuerpos de clase cambiada” (class switched antibodies). Los métodos para producir los anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección de genes, que ahora ya son bien conocidas en genética, véase, p. ej., Morrison, S.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855, 1984; US 5,202,238 y US 5,204,244.

El término “anticuerpo humanizado” indica anticuerpos en los que el armazón (framework) o “regiones determinantes de complementariedad” (CDR) se han modificado para albergar la CDR de un inmunoglobulina de especificidad diferente si se compara con la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución, se injerta la CDR murina en una región de armazón de un anticuerpo humano para preparar el “anticuerpo humanizado”, véase p. ej., Riechmann, L. y col., Nature 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314, 268-270, 1985. Las CDRs especialmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos antes mencionados en el caso de anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

El término “anticuerpo humano” se emplea aquí para incluir a los anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de la inmunoglobulina de línea germinal humana. 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, 368-374, 2001). En base a tal tecnología se han producido anticuerpos humanos contra una gran variedad de dianas.

Son ejemplos de anticuerpos humanos entre otros los descritos por Kellermann, S.A. y col., Curr. Opin. Biotechnol. 13, 593-597, 2002.

El término "anticuerpo humano recombinante" se emplea aquí para incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, por ejemplo los anticuerpos aislados a partir de una célula hospedante de tipo célula NS0 o CHO o a partir de un animal (p. ej. un ratón) que es transgénico de los genes de inmunoglobulina humana o los anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado a una célula hospedante. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de la inmunoglobulina de línea germinal humana en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes de la invención se han sometido a una hipermutación somática "in vivo". Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, en tanto que derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de línea germinal humana, es posible que no existan en la naturaleza dentro del repertorio "in vivo" de línea germinal humana de anticuerpos.

Tal como se emplea aquí, "se une de modo específico" indica un anticuerpo que se une de modo específico al antígeno tumoral (respecto al cual el anticuerpo es específico). Con preferencia La afinidad de unión tiene con preferencia un valor K_D de 10^{-8} moles/l o superior (p. ej. 10^{-9} moles/l), con preferencia un valor K_D de 10^{-9} moles/l o superior, con mayor preferencia un valor K_D de 10^{-10} moles/l o superior. La afinidad de unión se determina por un ensayo estándar de unión, por ejemplo mediante una técnica de resonancia de plasmón de superficie (Biacore®).

El término "molécula de ácido nucleico", se emplea aquí para incluir las moléculas de DNA y las moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra simple o de hebra doble, pero el DNA es con preferencia de hebra doble.

Los "dominios constantes" no intervienen directamente en la unión del anticuerpo y el antígeno, pero participan en las funciones efectoras (ADCC, unión de complemento y CDC).

La "región variable" (región variable de cadena corta (VL), región variable de cadena larga (VH)) se emplea aquí para indicar cada una del par de cadenas corta y larga que intervienen directamente en la unión del anticuerpo y el antígeno. Los dominios de las cadenas corta y larga variables humanas tienen la misma estructura general y cada dominio consta de cuatro regiones de armazón (framework, FR), cuyas secuencias están conservadas en alto grado, conectadas a tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDRs). Las regiones de armazón adoptan la conformación de hoja β (β -sheet) y las CDRs pueden formar bucles que conectan con la estructura de hoja β . Las CDRs de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional gracias a las regiones de armazón y junto con las CDRs de la otra cadena forman el sitio de unión con el antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas larga y corta del anticuerpo desempeñan un papel especialmente importante en la especificidad de unión y la afinidad de los anticuerpos de la invención y por ello constituyen un objeto adicional de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de un anticuerpo que se une al antígeno" se emplean aquí para indicar los restos aminoácidos de un anticuerpo que permiten realizar la unión con el antígeno. La región hipervariable contiene restos aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs". Las regiones de armazón (framework) o "FR" son aquellas regiones de dominios variables distintas de los restos de la región hipervariable aquí definidos. Por lo tanto, las cadenas corta y larga de un anticuerpo desde el extremo N al extremo C contienen los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En especial el dominio CDR3 de la cadena larga es la región que más contribuye a la unión con el antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan con arreglo a la definición estándar de Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) y/o los restos de un "bucle hipervariable".

Un "antígeno tumoral" se emplea aquí para incluir el significado ya conocido en la técnica, a saber, cualquier molécula que se expresa en (o está asociada con el desarrollo de) una célula tumoral, de la que ya se sabe o se sospecha que contribuye a las características tumorígenas de dicha célula tumoral. En la técnica se conocen numerosos antígenos tumorales. Si una molécula es un antígeno tumoral puede determinarse también con arreglo a técnicas y ensayos bien conocidos de los expertos en genética, por ejemplo los ensayos clonogénicos, ensayos de transformación, ensayos de formación de tumores "in vitro" o "in vivo", ensayos de migración a través de gel, ensayos de inactivación ("knockout") de genes, etc. Cuando se emplea aquí, el término "antígeno tumoral" indica con preferencia una proteína transmembrana humana, es decir, una proteína de la membrana celular, que está anclada en la bicapa lipídica de las células. La proteína transmembrana humana contendrá por lo general un "dominio extracelular" que tal como se emplea aquí indica que puede unirse a un ligando; un dominio transmembrana lipófilo, un dominio intracelular conservado, un dominio de tirosina-quinasa y un dominio de señalización con grupo carboxilo terminal, que alberga varios restos tirosina que pueden estar fosforilados. Los antígenos tumorales incluyen moléculas de tipo EGFR, HER2/neu, HER3, HER4, Ep-CAM, CEA, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, receptor 2 de TRAIL, receptor de linfotóxina beta, CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, CD33, CD40, CD80, CSF-1R, CTLA-4, proteína de activación de fibroblastos (FAP), hepsina, proteoglicano sulfato de condroitina asociado con el melanoma (MCSP), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor 1 de VEGF, receptor 2 de

VEGF, IGF-1R, TSLP-R, TIE-1, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de apoptosis similar al TNF (TWEAK), IL-1R, con preferencia EGFR, HER2/neu, CEA, CD20, o IGF-1R; con mayor preferencia HER2/neu o EGFR, con mayor preferencia todavía HER2/neu.

5 El término antígeno tumoral “expresado en exceso” o “sobrexpresado” o la “expresión excesiva” del antígeno tumoral se emplea para indicar un nivel anormal de expresión del antígeno tumoral en una célula partiendo de una zona enferma, por ejemplo un tumor sólido, dentro de un tejido o de un órgano específicos del paciente, comparado con el nivel de expresión de una célula normal de dicho tejido u órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos
10 caracterizados por la expresión excesiva del antígeno tumoral pueden determinarse mediante ensayos estándar ya conocidos de la técnica. La expresión excesiva se determina con preferencia en células fijadas de un tejido congelado o inmerso en parafina realizando una detección inmunohistoquímica (IHC). Cuando se combina con una tinción histológica se puede determinar la localización de la proteína diana y puede medirse de modo cualitativo semicuantitativo su grado de expresión dentro del tumor. Estos ensayos de detección IHC ya son conocidos en la técnica e incluyen p. ej. el llamado Clinical Trial Assay (CTA), el ensayo comercial LabCorp 4D5 para el antígeno
15 HER2 y el ensayo comercial DAKO HercepTest[®] (DAKO, Carpinteria, Calif.) para el antígeno tumoral HER2. En este último ensayo se realiza un intervalo específico de tinción celular de 0 a 3+ (en el que 0 es la expresión normal y 3+ indica la expresión positiva máxima) para identificar los tipos de cáncer que tienen una expresión excesiva de la proteína HER2 (véase la información de prescripción completa de Herceptin[®] (trastuzumab); septiembre de 1998; Genentech, Inc., San Francisco, Calif.). De este modo, p. ej. con respecto a los pacientes de un antígeno tumoral
20 HER2 que tienen un tumor sólido caracterizado por la expresión excesiva del antígeno tumoral HER2 en el intervalo de 1+, 2+ o 3+, con preferencia 2+ o 3+, con mayor preferencia 3+, dichos pacientes se beneficiarían de los métodos de terapia de la presente invención. Como alternativa, tal expresión excesiva puede detectarse determinando la señal de fluorescencia NIR en una región del tumor sólido de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a dicho antígeno tumoral y comparando dicha señal de fluorescencia NIR o la imagen de una región del tumor sólido con la señal de fluorescencia NIR o con la imagen de un tejido no tumorado o con otros tumores que no expresen en exceso dicho antígeno tumoral (véase p. ej. los ejemplos 1 y 2, las figuras 1 y 2).

30 La expresión “los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada” se refiere al primer anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral y al segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, pero ninguno de estos dos anticuerpos presenta reactividad cruzada con respecto a dicho antígeno tumoral. La reactividad cruzada de estos dos anticuerpos con respecto al mismo antígeno tumoral puede detectarse mediante un ensayo competitivo. Para tal fin, p. ej. mediante un inmunoensayo enzimático, se comprueban el grado en el que el primer anticuerpo compite con el segundo anticuerpo para realizar la unión con un antígeno tumoral inmovilizado. Para este fin se incuban un antígeno tumoral debidamente inmovilizado con un primer anticuerpo que está conjugado con fines de ensayo con un resto detectable y un exceso del segundo anticuerpo. Los restos detectables incluyen los sistemas detectables directa o indirectamente. Detectando el marcador unido se puede evaluar con facilidad el grado en el que el anticuerpo en cuestión puede desplazar al anticuerpo conocido del sitio de unión que ocupaba. Si el grado de desplazamiento es superior al 10 %, con preferencia superior al 20 %, para la misma concentración o para concentraciones superiores, con preferencia en el caso de un exceso 105 del segundo anticuerpo, referido al anticuerpo conocido, entonces los dos anticuerpos presentan reactividad cruzada. Esto significa que los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapado (véase los ejemplos sin reactividad cruzada y los ejemplos con reactividad cruzada de los ejemplos 3, 4 y 5, las figuras 3, 4 y 5).

45 Empleando tales anticuerpos primero y segundo, que no presentan reactividad cruzada, se logra una proporción señal/fondo claramente mejorada (= superior) (véase p. ej. el ejemplo 3: $2,88 = 1440 \text{ MFI}/500 \text{ MFI}$ - de pertuzumab marcado con Cy5 después del tratamiento con pertuzumab - figura 3b) comparada con la proporción señal/fondo de los anticuerpos primero y segundo, que presentan reactividad cruzada (véase p. ej. el ejemplo 3: $1,06 = 530 \text{ MFI}/500 \text{ MFI}$ - de trastuzumab marcado con Cy5 después del tratamiento con trastuzumab, figura 3a). Esto da pie a una mejor localización de la región de tumor que con el uso de anticuerpos que presentan reactividad cruzada; incluso cuando se administra menor cantidad de anticuerpo marcado con NIRF. De este modo, empleando tales anticuerpos primero y segundo que no presentan reactividad cruzada se obtiene una t eficaz.

55 Se obtiene, pues, empleando tales anticuerpos primero y segundo que no presentan reactividad cruzada una relación de señal/fondo que es por lo menos 1,5, con preferencia por lo menos 2,0.

60 La abreviatura MFI indica la intensidad de señal de fluorescencia NIR (NIRF) media [unidades arbitrarias]. La intensidad de la señal de fluorescencia NIR puede cuantificarse sumando el número y las intensidades de señal de los píxeles de la región de interés (ROI).

65 El término “relación señal/fondo” indica la proporción entre la señal y el fondo de la señal de fluorescencia NIR en cuestión (determinada como MFI) en la región de interés (ROI), p. ej., la región del tumor sólido y la correspondiente señal de fondo de la fluorescencia NIR (determinada como MFI), p. ej. la señal medida en un tejido no tumoral.

En el ensayo competitivo anterior, los retos conjugados del primer anticuerpo que pueden detectarse directamente (solo con fines de ensayo) incluyen p. ej. los cromógenos (grupos y colorantes fluorescentes o luminiscentes), las enzimas, los grupos o partículas metálicas activos en RMN, los haptenos, p. ej. la digoxigenina, que son ejemplos de marcadores detectables. Los sistemas de detección directa comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, p. ej., el anticuerpo de detección esté marcado con un primer elemento de un par de unión bioafín. Los ejemplos de pares de unión adecuados son hapteno o antígeno / anticuerpo, biotina o análogos de biotina, por ejemplo aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina / avidina o estreptavidina, azúcar / lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico / ácido nucleico complementario y receptor / ligando, p. ej., receptor de hormona esteroidea / hormona esteroidea. Los primeros elementos preferidos de los pares de unión comprenden el hapteno, el antígeno y la hormona. Son preferidos en especial los haptenos de tipo digoxina y biotina y los análogos de las mismas. El segundo elemento de tal par de unión, p. ej. un anticuerpo, la estreptavidina, etc., normalmente está marcado para permitir la detección directa, p. ej. con los marcadores ya mencionados previamente. El marcador detectable puede ser también un grupo de engarce cruzado fotoactivable, p. ej. un grupo azido o un grupo aziridina. Los quelatos metálicos que pueden detectarse por electroquimioluminiscencia son también grupos emisores de señales preferidos, siendo especialmente preferidos los quelatos de rutenio, por ejemplo un quelato de (bispiridilo) de rutenio 32+. Los grupos marcadores de rutenio adecuados se han descrito por ejemplo en las patentes EP 0 580 979, WO 90/05301, WO 90/11511 y WO 92/14138.

Los ejemplos de tales anticuerpos primero y segundo que se unen al mismo antígeno tumoral, que no presentan reactividad cruzada, son p. ej. los dos anticuerpos anti-HER2, el trastuzumab y el pertuzumab, o los dos anticuerpos anti-EGFR, el cetuximab y el rhMab ICR62. Sin embargo, un experto puede general fácilmente otros anticuerpos sin reactividad cruzada contra el antígeno tumoral, por ejemplo el EGFR, HER2/neu, HER3, HER4, Ep-CAM, CEA, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, receptor 2 de TRAIL, receptor de linfotóxina-beta, CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, CD33, CD40, CD80, CSF1R, CTLA-4, proteína de activación de fibroblastos (FAP), hepsina, proteoglicano sulfato de condroitina asociado con el melanoma (MCSP), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, IGF-1R, TSLP-R, TIE-1, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de apoptosis similar al TNF (TWEAK), IL-1R, con preferencia EGFR, HER2/neu, CEA, CD20, o IGF-1R. Para este fin pueden aplicarse p. ej. las técnicas de presentación de fagos (phage display) (descritas por Henderikx y col., Cancer Res. 58, 4324-4332, 1998; Huse y col., Science 246, 1275-1281, 1989 o Kang y col., PNAS 88, 11120-11123, 1991) y posterior quimerización y/o humanización. En biología se conocen también técnicas de inmunización, por ejemplo puede aplicarse la inmunización con el antígeno tumoral relevante (p. ej. su DNA, la proteína o fragmentos de la misma) para generar este tipo de anticuerpos. Los anticuerpos humanos contra el IGF-1R pueden prepararse p. ej. con arreglo al proceso siguiente.

Generación de una línea celular de hibridoma que produzca anticuerpos anti-IGF-1R

Cultivo de hibridomas

Se cultivan a 37°C y con un 5% de CO₂ los hibridomas de huMab generados en un medio de tipo Hybridoma Express Medium (PAA Laboratories GmbH, Austria) suplementado con 2 mM L-glutamina (BioWhittaker) y 4% de Origen Cloning Factor (Igen, Francia); o en un medio de tipo Iscoves Modified Dulbecco's Medium (500 ml: BioWhittaker Europe, Bélgica) suplementado con un suero de tipo Fetal Clone Serum (50 ml: Hyclone, Utah) y Origen Hybridoma Cloning Factor (30 ml: Igen, Gaithersburg MD).

Proceso de inmunización de ratones transgénicos

Se inmunizan de forma alterna diez ratones transgénicos HCo7 (4 machos y 6 hembras), cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, EE. UU.) con 1x10⁶ células NIH 3T3, transfectadas con un vector de expresión para el IGF-1R y 20 µg de dominio extracelular soluble de IGF-1R. En total se realizan seis inmunizaciones, tres inmunizaciones intraperitoneales (IP) con células que expresan el IGF-1R y tres inmunizaciones subcutáneas (SC) en la base de la cola con la proteína recombinante. Para la primera inmunización se mezclan 100 µl de 1x10⁶ células NIH 3T3 IGF-1R con 100 µl de adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, EE. UU.). Para las demás inmunizaciones restantes se emplean 100 µl de células en PBS o se mezcla la proteína recombinante con 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (ICFA; Difco).

ELISA específico de antígeno

Se determinan las concentraciones de anti-IGF-1R en el suero de los ratones inmunizados realizando un ensayo ELISA específico de antígeno. En placas de 96 hoyos se recubre durante una noche a 4°C o durante dos horas a 37°C el dominio extracelular soluble del IGF-1R en una concentración de 1 µg/ml en PBS. A continuación se bloquean los hoyos con PBSTC (PBS suplementado con un 0,05% de Tween[®] 20 y un 2% de suero de pollo (Gibco BRL)) a temperatura ambiente durante 1 hora (h). Se diluyen los primeros sueros extraídos (vaciados) a razón de 1/50 en PBSTC, los sueros extraídos (vaciados) restantes se prediluyen a razón de 1/100 en PBSTC y se diluyen en series hasta 1/6400. Se añaden los sueros diluidos a los hoyos y se incuban a 37°C durante 1 h. Se emplea el suero previo a la extracción (vaciado) como control negativo. Como control positivo se emplean 200 ng/ml del IGF-1R de

5 cabra anti-humano (100 µg/ml). A continuación se lavan las placas dos veces con PBST y se incuban con IgG F(ab')₂ de rata anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (DAKO), diluida 1/2000 en PBSTC a 37°C durante 1 h. Se lavan los hoyos dos veces con PBST y se realizan los ensayos con una solución de ABTS® recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos y en la oscuridad. Se mide la absorbancia a 405 nm.

Análisis FACS

10 Además de la determinación mediante un ensayo ELISA específico del antígeno, las concentraciones de anti-IGF-1R en el suero de los ratones inmunizados se pueden determinar también con análisis FACS. Las células NIH 3T3 IGF-1R y las células NIH 3T3 originales se incuban con sueros diluidos a 4°C durante 30 minutos. Se realizan de modo alternado inmunizaciones IP y SC en intervalos de dos semanas, empezando con una inmunización IP. Se emplea el suero previo a la extracción o vaciado (células NIH 3T3 originales) como control negativo. Inicialmente se emplean como control positivo 200 ng/ml de IGF-1R de cabra anti-humana. Se lavan las células tres veces con PBS
15 suplementado con un 1% de albúmina de suero bovino y un 0,01% de azida. A continuación se incuban a 4°C durante 30 minutos las células con fragmentos de unión con el antígeno (fragmentos F(ab')₂) conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) de la IgG de rata antihumana, diluidos a razón de 1/100 en tampón FACS. Se lavan las células dos veces en tampón FACS y se analizan las muestras en un aparato FACSCalibur (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Bélgica).

20 Intensificación (boosting) de los ratones

25 Cuando se encuentran concentraciones suficientes de anti-IGF-1R en el suero, se intensifican los ratones de modo adicional dos veces con 15 µg de dominio extracelular de IGF-1R en 200 µl de PBS por vía intravenosa (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación de hibridoma

30 Se sacrifican los ratones y se les extraen el bazo y los nódulos linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. Se realiza la fusión de los esplenocitos y las células de los nódulos linfáticos con las células del llamado reactivo de fusión "fusion partner SP 2.0" con arreglo a procesos operativos estándar.

ELISA κ

35 Para determinar si los hibridomas que resultan de la fusión generan anticuerpos humanos se lleva a cabo un ensayo ELISA κ. Se recubren las placas ELISA con un anticuerpo de cadena corta κ de IgG de rata antihumano (DAKO) diluido a razón de 1/10000 en PBS y se realiza una incubación a 4°C durante una noche. Después de descartar los hoyos, se bloquean las placas por incubación con PBSTC a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se incuban los hoyos con el líquido sobrenadante del cultivo de hibridoma, diluido a razón de 1/2 en PBSTC. El medio
40 de cultivo diluido a razón de 1/2 en PBSTC se emplea como control negativo, mientras que el suero de ratón positivo de cadena corta κ diluido a razón de 1/100 en PBSTC se emplea como control positivo. A continuación se lavan los hoyos tres veces y se incuban con F(ab')₂ de IgG rata antihumana conjugado con HRP (DAKO), diluido a razón de 1/2000 en PBSTC a 37°C durante 1 h. Se lavan los hoyos tres veces y se llevan a cabo los ensayos con una solución de ABTS® (1 mg/ml) recién preparada a temperatura ambiente (RT) y en la oscuridad durante 30 minutos.
45 Se mide la absorbancia a 405 nm en un lector de placas ELISA.

De este modo pueden generarse bibliotecas de anticuerpos anti-IGF-1R.

50 Después pueden probarse todos los anticuerpos en tales bibliotecas (generados por esta técnica o por otra técnica de inmunización o de presentación de fagos (phage display)), p. ej. mediante un inmunoensayo enzimático (véase la definición general anterior y también el ejemplo anterior de ensayo ELISA específico del antígeno IGF-1R), tanto si presentan reactividad cruzada con respecto al mismo antígeno tumoral como si no la presentan. De este modo, un experto podrá generar con facilidad pares de anticuerpos primero y segundo que se unen de modo específico al mismo antígeno tumoral y que no presentan reactividad cruzada.

55 Por ejemplo empleando esta técnica de inmunización de esta manera, un experto podrá generar un segundo anticuerpo sin reactividad cruzada y que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral que el primer anticuerpo no marcado elegido entre el grupo formado por: alemtuzumab, apolizumab, cetuximab, epratuzumab, galiximab, gemtuzumab, ipilimumab, labetuzumab, panitumumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab,
60 mapatumumab, matuzumab, rhMab ICR62 y pertuzumab. Este segundo anticuerpo sin reactividad cruzada puede marcarse seguidamente con un marcador NIRF (p. ej. el Cy5) y emplearse en una de las formas de ejecución de la invención.

65 El término "tumor" se emplea aquí para indicar o describir un estado patológico de los mamíferos, que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular incontrolado. Los ejemplos de tumores incluyen, pero no se limitan a:

carcinoma, linfoma, blastoma (incluidos el meduloblastoma y el retinoblastoma), sarcoma (incluidos el liposarcoma y el sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluidos los tumores carcinoides, el gastrinoma y el cáncer de las células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluido el neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma y melanoma.

5 El término “tumores sólidos” se emplea aquí para indicar tumores elegidos entre el grupo formado por el cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer de testículos, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, así como el cáncer de cabeza y cuello, con preferencia el cáncer de mama.

15 El término “región de un tumor sólido” se emplea aquí para indicar una zona que contiene el tumor sólido. La región de un tumor sólido puede comprender el tumor sólido en su totalidad o solamente partes regionales del mismo. Se mide la señal de fluorescencia NIR en la región de dicho tumor sólido y se obtienen las correspondientes imágenes de fluorescencia NIR en forma bidimensional o tridimensional, p. ej. comparándolas con las del tejido circundante no tumoral o comparándolas con las señales de fluorescencia NIR o con las imágenes de diferentes puntos temporales tomadas como referencia.

20 Los términos “co-administración”, “co-administrado” o “co-administrar” se emplean aquí para indicar que se administra el anticuerpo monoclonal marcado junto con el anticuerpo monoclonal no marcado. La administración del anticuerpo marcado junto con el anticuerpo no marcado puede llevarse a cabo en forma de formulación individual o en forma de dos formulaciones separadas (una para el anticuerpo no marcado y otra para el anticuerpo marcado). La co-administración puede ser simultánea o sucesiva en cualquier orden, pero habrá con preferencia un período de tiempo en el que los dos anticuerpos monoclonales se unirán simultáneamente al mismo antígeno tumoral del tumor sólido, en el supuesto de que el tumor ya exista y en el supuesto de que el tumor exprese de modo excesivo dicho antígeno tumoral. Si se emplea una formulación individual, los dos anticuerpos se co-administran al mismo tiempo. Si se emplean dos formulaciones separadas (una para el anticuerpo no marcado y otra para el anticuerpo marcado), entonces los dos anticuerpos se co-administran de modo simultáneo (p. ej. mediante una única infusión continua o bien mediante dos infusiones continuas realizadas al mismo tiempo) o sucesivo. Si los dos anticuerpos se co-administran de modo sucesivo, el anticuerpo marcado puede administrarse antes o después que el anticuerpo no marcado, ya sea el mismo día en dos administraciones separadas, o p. ej. se administra el anticuerpo marcado el día 1 para obtener una imagen de fluorescencia NIR y después se co-administra el anticuerpo no marcado, p. ej. entre el día 2 y el día 7. Entonces, después de un cierto período de tiempo, p. ej. de una a 5 semanas, que puede incluir una administración adicional del anticuerpo no marcado, se administra de nuevo el anticuerpo marcado con un marcador de fluorescencia NIR para obtener una imagen de fluorescencia NIR. Comparando estas imágenes de fluorescencia NIR que se obtienen con preferencia en la región del tumor sólido aplicando las mismas condiciones (p. ej. la misma cantidad de anticuerpo marcado, el mismo punto temporal después de la administración, el mismo tiempo para la obtención, etc.), se realizará una administración adicional del anticuerpo no marcado si la señal de fluorescencia NIR ha disminuido por lo menos en un 10%, con preferencia por lo menos en un 20% y con mayor preferencia por lo menos en un 30 %.

45 El término “dosis” se emplea aquí para indicar la administración de los anticuerpos monoclonales. La “dosis” de los anticuerpos monoclonales no marcados, puede situarse p. ej. en el intervalo comprendido aprox. entre 0,05 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto pueden administrarse al paciente una o varias dosis consecutivas aprox. de 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg de peso corporal. Tales dosis pueden administrarse de modo intermitente, p. ej. cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas, (p. ej. de modo que el paciente reciba aproximadamente de dos a veinte, p. ej. unas seis dosis tanto de trastuzumab como de pertuzumab). Además puede administrarse una dosis inicial de carga más elevada, seguida por una o varias dosis menores. De este modo se co-administra el anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en una cantidad o dosis por lo menos de 0,001 mg/kg de peso corporal, con preferencia por lo menos 0,01 mg /kg de peso corporal, con mayor preferencia por lo menos 0,01 mg/kg de peso corporal. La cantidad o “dosis” exacta puede variar y dependerá p. ej. del marcador y de su rendimiento cuántico. El experto podrá definir la cantidad o “dosis” del anticuerpo monoclonal no marcado y la del anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR mediante ensayos rutinarios simples.

60 El término “régimen de administración del medicamento” se emplea aquí para indicar con preferencia los pasos sucesivos durante administración de dicho medicamento, que pueden incluir las administraciones del mismo, la medición de las señales de fluorescencia NIR en la región del tumor sólido, la comparación de diferentes señales de fluorescencia NIR en la región del mismo tumor sólido medidas en las mismas condiciones, p. ej. antes y después de la administración del anticuerpo monoclonal no marcado, la administración de dosis adicionales del anticuerpo monoclonal no marcado basada en los resultados que indican que las señales de fluorescencia NIR en la región del mismo tumor sólido han disminuido durante el tratamiento.

65 El término “durante dicho tratamiento” con un primer anticuerpo monoclonal no marcado se emplea aquí para indicar la co-administración del segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR que puede

5 ser simultánea o sucesiva en cualquier orden, siendo preferido un período de tiempo en el que los dos anticuerpos monoclonales se unen de modo simultáneo al mismo antígeno tumoral del tumor sólido, en el supuesto de que el tumor ya exista y en el supuesto de que el tumor exprese o exprese en exceso a dicho antígeno tumoral. En relación con el término “durante dicho tratamiento” con un primer anticuerpo monoclonal no marcado, el período de tratamiento de dicho primer anticuerpo monoclonal no marcado empieza en la administración de la primera dosis (y puede incluir varias administraciones consecutivas de dicho primer anticuerpo, pero siempre hay presente una cantidad (con preferencia una cantidad terapéuticamente eficaz) de dicho anticuerpo en el paciente) y termina en el momento, en el que, después de la última administración de dicho primer anticuerpo, dicho primer anticuerpo se haya degradado por completo dentro de dicho paciente (con preferencia cuando dicho primer anticuerpo se haya degradado hasta quedar en una cantidad residual que es inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz).

15 La expresión “paciente que sufre un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral tratado previamente con dicho anticuerpo monoclonal no marcado” se emplea aquí para indicar que se ha administrado a dicho paciente por lo menos una de dichas dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado antes del tratamiento del paciente con los dos anticuerpos monoclonales.

20 Es evidente de por sí que el anticuerpo no marcado administrado al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz, que es la cantidad del compuesto en cuestión o de la combinación que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que está siendo atendido por un investigador, un veterinario, un médico u otro facultativo clínico.

25 El término “paciente” se emplea aquí con preferencia para indicar un ser humano que necesita un tratamiento contra el cáncer, o contra un estado patológico precanceroso o una lesión. Sin embargo, el término “paciente” puede referirse también a animales no humanos, con preferencia a mamíferos del tipo perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos, entre otros, que necesiten dicho tratamiento.

30 Los términos “anticuerpo marcado con un marcador de fluorescencia NIR”, “anticuerpo marcado” o “anticuerpo monoclonal marcado” se emplean aquí para indicar anticuerpos monoclonales que están conjugados con un marcador de fluorescencia NIR. Las técnicas de conjugación han avanzado de modo significativo durante los últimos años y se han repasado de modo excelente en Aslam, M. y Dent, A., Bioconjugation, Londres (1998), pp. 216-363 y en el capítulo “Macromolecule conjugation” del manual de Tijssen, P. “Practice and theory of enzyme immunoassays”, Elsevier, Amsterdam (1990), pp. 221-278.

35 El término “anticuerpo no marcado” se emplea aquí para indicar un anticuerpo monoclonal que no está marcado con un marcador de fluorescencia NIR ni está conjugado con otro resto.

El término “NIR” se emplea aquí para indicar infrarrojo próximo.

40 La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene:

- a) un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral y
- b) un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral,

45 caracterizada porque, los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

50 Tal composición puede constar de un compartimento que contenga los dos anticuerpos en una sola formulación o de dos compartimentos, uno de los cuales contenga el anticuerpo monoclonal no marcado en una primera formulación y el otro contenga el anticuerpo monoclonal marcado en una segunda formulación. Tal composición está destinada a la co-administración de tal anticuerpo monoclonal no marcado y del anticuerpo monoclonal marcado.

55 En una forma de ejecución, dicho antígeno tumoral se elige entre el grupo formado por el EGFR, HER2/neu, HER3, HER4, Ep-CAM, CEA, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, receptor 2 de TRAIL, receptor de linfotóxina beta, CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, CD33, CD40, CD80, CSF1R, CTLA-4, proteína de activación de fibroblastos (FAP), hepsina, proteoglicano sulfato de condroitina asociado con el melanoma (MCSP), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, IGF-1R, TSLP-R, TIE-1, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de apoptosis similar al TNF (TWEAK), IL-1R, con preferencia EGFR, HER2/neu, CEA, CD20, o IGF-1R; con mayor preferencia el HER2/neu o el EGFR, con mayor preferencia todavía el HER2/neu.

60 En otra forma de ejecución, el anticuerpo monoclonal no marcado es un anticuerpo anti-HER2, con preferencia el trastuzumab o el pertuzumab, con mayor preferencia el trastuzumab.

65 En otra forma de ejecución, el anticuerpo monoclonal no marcado es un anticuerpo anti-EGFR, con preferencia el cetuximab, el rhMab ICR62, el nimotuzumab o el matuzumab, con mayor preferencia el cetuximab o el rhMab ICR62.

En otra forma de ejecución, el anticuerpo monoclonal no marcado es un anticuerpo anti-IGF1R.

En otra forma de ejecución, el anticuerpo monoclonal no marcado se elige entre el grupo formado por:

5 el alemtuzumab, apolizumab, cetuximab, epratuzumab, galiximab, gemtuzumab, ipilimumab, labetuzumab, panitumumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, mapatumumab, matuzumab, rhMab ICR62 y pertuzumab, con preferencia el trastuzumab, el cetuximab, el rhMab ICR62 y el pertuzumab, con mayor preferencia el trastuzumab.

10 La composición contiene normalmente el anticuerpo marcado con un marcador de fluorescencia NIR en una cantidad de por lo menos 0,001 mg/kg de peso corporal, con preferencia por lo menos 0,01 mg /kg de peso corporal, con mayor preferencia por lo menos 0,01 mg/kg de peso corporal. La cantidad exacta puede variar y dependerá p. ej. del marcador y de su rendimiento cuántico. El experto podrá definir fácilmente la cantidad realizando ensayos rutinarios simples.

15 El trastuzumab (que puede adquirirse con el nombre comercial de Herceptin[®]) es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante anti-HER2 empleado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico expresado en exceso en el gen HER2 o amplificado en el gen HER2. El trastuzumab se une de modo específico al mismo epítipo del HER2 que el anticuerpo murino anti-HER2 4D5 descrito por Hudziak, R.M. y col., Mol. Cell. Biol. 9, 1165-1172, 1989. El trastuzumab es una versión humanizada recombinante del anticuerpo murino anti-HER2 4D5, también
20 llamado rhuMab 4D5 o trastuzumab) y ha desplegado actividad clínica en pacientes que padecen cáncer de mama metastásico que expresa en exceso el gen HER2 y que previamente han recibido terapia anticancerosa intensa (Baselga, J. y col., J. Clin. Oncol. 14, 737-744, 1996). El trastuzumab y su método de preparación se describen en la patente US 5,821,337.

25 El pertuzumab (Omnitarg[®]) es otro anticuerpo monoclonal humanizado recombinante anti-HER2 empleado para el tratamiento de tipos de cáncer positivos en HER2. El pertuzumab se une de modo específico el epítipo 2C4, un epítipo diferente del dominio extracelular de HER2 al que se une el trastuzumab. El pertuzumab es el primero de una nueva clase de inhibidores de la dimerización del HER (HDI). Gracias a su unión al dominio extracelular HER2, el pertuzumab bloquea la heterodimerización de HER2 activada con ligando con otros miembros del grupo HER, con
30 lo cual inhibe los mecanismos posteriores (downstream) de señalización y los procesos celulares asociados con el crecimiento y la progresión de los tumores (Franklin, M.C. y col., Cancer Cell 5, 317-328, 2004 y Friess, T. y col., Clin. Cancer Res. 11, 5300-5309, 2005). El pertuzumab es una versión humanizada recombinante del anticuerpo murino anti-HER2 2C4 (también llamado rhuMab 2C4 o pertuzumab) y que se ha descrito junto con el correspondiente método de obtención en los documentos WO 01/00245 y WO 2006/007398.

35 El trastuzumab y el pertuzumab son ejemplos de los anticuerpos monoclonales primero y segundo que se unen de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizados porque, dichos anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada. Otros ejemplos incluyen a los dos anticuerpos anti-EGFR, el cetuximab y el rhMab ICR62.

40 El cetuximab es anticuerpo quimérico monoclonal anti-EGFR 225 (c MAb 225, US 4,943,533 y EP 0359 282) para emplear en el tratamiento de tumores que expresan el EGFR. Se ha constatado que el anticuerpo C225 (cetuximab) inhibe la cascada de células tumorales mediada por el EGF.

45 El rhMab ICR62, otro anticuerpo anti-EGFR, es versión humanizada recombinante del anticuerpo ICR62 de la rata y se ha descrito en WO 2006/082515.

50 Los dos anticuerpos anti-EGFR, el cetuximab y el rhMab ICR62, representan ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales primero y segundo que se unen de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizados porque dichos anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

55 Otro aspecto de la invención es el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, en el que el anticuerpo monoclonal no marcado se co-administra junto con un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

60 Es un aspecto de la invención el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, caracterizado porque se obtiene una imagen de fluorescencia NIR de dicho paciente.

En otro aspecto de la invención, dicho uso está caracterizado porque se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral en una región del tumor sólido.

5 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral tratado previamente con dicho anticuerpo monoclonal no marcado y un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, en el que después de dicho tratamiento previo disminuye la señal de fluorescencia NIR
10 en una región del tumor sólido por lo menos en un 10%, con preferencia por lo menos en un 20%, con mayor preferencia por lo menos en un 30%, con respecto a la señal de fluorescencia NIR en dicha región del tumor sólido antes de dicho tratamiento previo con dicho anticuerpo monoclonal no marcado;

caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

15 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, en el que el régimen de administración del medicamento consta de los pasos siguientes:

- 20 a) el paciente recibe una primera dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado;
b) se mide la señal de fluorescencia NIR del segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, después de que dicha primera dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado haya disminuido por lo menos en un 10 %, con preferencia por lo
25 menos en un 20 %, con mayor preferencia por lo menos en un 30 % la señal de fluorescencia NIR en una región del tumor sólido con respecto a la señal de fluorescencia NIR de dicha región del tumor sólido existente antes de aplicar dicha primera dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado;
c) el paciente recibe una segunda dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado en base a los resultados obtenidos en la medición del paso b);

30 caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Los pasos de a) a c) se llevan a cabo con preferencia en forma de pasos consecutivos a), b) y c).

35 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, en el que el régimen de administración del medicamento consta de los pasos siguientes:

- 40 a) el paciente recibe una primera dosis de un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral;
b) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en una región del tumor sólido;
c) el paciente recibe una primera dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado;
45 d) el paciente recibe una segunda dosis de dicho segundo anticuerpo marcado con un marcador de fluorescencia NIR;
e) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en dicha región del tumor sólido y ha disminuido por lo menos en un 10%, con preferencia por lo
50 menos en un 20%, con mayor preferencia por lo menos en un 30%, comparada con la señal medida en el apartado b);
f) el paciente recibe una segunda dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado en base al resultado de la medición realizada en el paso e);

caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

55 Los pasos de a) a f) se llevan a cabo con preferencia en forma de pasos consecutivos a), b), c), d), e) y f).

60 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral.

65 Se describe también el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, en el que se emplea un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, para determinar la respuesta a dicho tratamiento, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

La expresión “para determinar la respuesta a dicho tratamiento” se emplea aquí para indicar la obtención de las señales de fluorescencia NIR o las imágenes durante el tratamiento del paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso a antígeno tumoral con un anticuerpo monoclonal no marcado. Pueden llevarse a cabo p. ej. varias mediciones en una región del tumor sólido en diferentes puntos temporales del tratamiento o pueden obtenerse varias imágenes de fluorescencia NIR del paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso a antígeno tumoral. La “respuesta” al tratamiento puede clasificarse para tumores sólidos que expresan en exceso a dicho antígeno tumoral en función de la disminución (aumento) de la señal de fluorescencia NIR en dicha región del tumor sólido, que guarda relación con la disminución (aumento) de la expresión de antígeno tumoral en dicha región del tumor sólido (véase p. ej. el ejemplo 4, figura 4). En relación a ello, otro aspecto preferido de la invención es el uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un tumor sólido, en el que se emplea un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, para determinar la expresión de dicho antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Los usos de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de una composición farmacéutica recién descrita así como los métodos descritos a continuación se caracterizan con preferencia porque dicho antígeno tumoral, contra el que van dirigidos de modo específico los dos anticuerpos monoclonales, se elige entre el grupo formado por el EGFR, HER2/neu, HER3, HER4, Ep-CAM, CEA, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, TRAIL-receptor 2, receptor de linfotoxina beta, CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, CD33, CD40, CD80, CSF-1R, CTLA-4, proteína de activación de fibroblastos (FAP), hepsina, proteoglicano sulfato de condroitina asociado con el melanoma (MCSP), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, IGF-1R, TSLP-R, TIE-1, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de apoptosis similar al TNF (TWEAK), IL-1R, con preferencia el EGFR, HER2/neu, CEA, CD20, o IGF-1R; con mayor preferencia el HER2/neu.

Se describe también un método no invasivo de obtención una imagen de fluorescencia NIR de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso a antígeno tumoral que ya ha recibido una dosis de un primer anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a dicho antígeno tumoral y una dosis de un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, en el que se mide la señal de fluorescencia NIR de una región del tumor sólido y está caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Otro aspecto de la invención es un método no invasivo de obtención una imagen de fluorescencia NIR, en el que se mide la señal de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a un antígeno tumoral, en una región de un tumor sólido durante el tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso al antígeno tumoral con un anticuerpo monoclonal que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Se describe también un método no invasivo para determinar la señal de fluorescencia NIR de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a un antígeno tumoral en una región del tumor sólido durante el tratamiento de un paciente, que sufra un tumor sólido que expresa en exceso al antígeno tumoral, con un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, en el que se efectúan los pasos siguientes:

- a) el paciente recibe una primera dosis de un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, dichos anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada;
- b) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en una región del tumor sólido;
- c) el paciente recibe una primera dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado;
- d) el paciente recibe una segunda dosis de dicho segundo anticuerpo marcado con un marcador de fluorescencia NIR;
- e) se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR en dicha región del tumor sólido y ha disminuido por lo menos en un 10%, con preferencia por lo menos en un 20%, con mayor preferencia por lo menos en un 30%, comparada con la señal medida en el apartado b);
- f) el paciente recibe una segunda dosis de dicho anticuerpo monoclonal no marcado en base al resultado de la medición realizada en el paso e);

caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Se efectúan los pasos de a) a f) con preferencia en forma de pasos consecutivos a), b), c), d), e) y f).

En tales métodos, la proporción entre señal fondo se sitúa con preferencia por lo menos en 1,5, con preferencia en 2.0.

5 Dicho "anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR" está marcado con un marcador de fluorescencia infrarroja próxima (near infrared, NIR) adecuado para obtener una imagen de fluorescencia NIR en la región del tumor sólido.

10 Se emplean marcadores de fluorescencia NIR con longitudes de onda de excitación y de emisión dentro del espectro infrarrojo próximo, es decir, de 640 a 1300 nm, con preferencia de 640 a 1200 nm y con mayor preferencia de 640 a 900 nm. Con el uso de esta porción del espectro electromagnético se maximiza la penetración en los tejidos y se minimiza la absorción en absorbentes fisiológicamente abundantes, como son la hemoglobina (< 650 nm) y el agua (> 1200 nm). Los fluorocromos del infrarrojo próximo ideales para el uso "in vivo" presentan:

- 15 (1) características espectrales estrechas,
 (2) sensibilidad elevada (rendimiento cuántico),
 (3) biocompatibilidad y
 (4) desacoplamiento de los espectros de absorción y de excitación.

20 En el mercado se suministran varios marcadores de fluorescencia infrarroja próxima (NIR) que pueden emplearse para preparar sonda con arreglo a esta invención. Los ejemplos de marcadores NIRF incluyen los siguientes : Cy5.5, Cy5 y Cy7 (Amersham, Arlington Hts., IL; IRD41 y IRD700 (LI-COR, Lincoln, NE); NIR-1, (Dejindo, Kumamoto, Japón); Lajolla Blue (Diatron, Miami, FL); verde de indocianina (ICG) y sus análogos (Licha, K. y col., Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng. 2927, 192-198, 1996; Ito y col., US 5,968,479); indotricarbocianina (ITC; WO 98/47538); y compuestos quelatos de lantánidos. Los metales lantánidos fluorescentes incluyen al europio y el terbio. Lackowicz ha descrito las propiedades fluorescentes de los lantánidos en Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2ª ed., Kluwar Academic, Nueva York (1999).

30 Por lo tanto, dicho "anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR" está marcado con preferencia con un marcador de fluorescencia NIR elegido entre el grupo formado por el Cy5.5, Cy5, Cy7, IRD41, IRD700, NIR-1, Lajolla Blue, verde de indocianina (ICG), indotricarbocianina (ITC) y SF64, 5-29, 5-36 y 5-41 (según el documento WO 2006/072580), con mayor preferencia dicho anticuerpo está marcado con un marcador NIRF elegido entre el grupo formado por el Cy5.5, el Cy5 y el Cy7.

35 Los métodos empleados para la fijación de los marcadores de fluorescencia NIR son bien conocidos en la técnica. Las técnicas de conjugación de marcadores de fluorescencia NIR con los anticuerpos han progresado de modo significativo en los últimos años y se han repasado de modo excelente en Aslam, M. y Dent, A., Bioconjugation, Londres (1998), pp. 216-363 y en el capítulo "Macromolecule conjugation" del manual de Tijssen, P. "Practice and theory of enzyme immunoassays", Elsevier, Amsterdam (1990).

40 Los métodos químicos apropiados de conjugación ya se conocen por la bibliografía química recién citada (Aslam, obra citada). El marcador de fluorescencia NIR, en función del resto de conjugación en el que está presente, puede reaccionar directamente con el anticuerpo en medio acuoso u orgánico. El resto de conjugación es un grupo reactivo o un grupo activado que se emplea para la unión química del marcador fluorocromo con el anticuerpo. El marcador fluorocromo puede fijarse directamente sobre el anticuerpo o bien conectarse al anticuerpo a través de un espaciador para formar un conjugado de marcador de fluorescencia NIR que consta de un anticuerpo y un marcador de fluorescencia NIR. El espaciador puede elegirse o diseñarse de modo que tenga de por sí una persistencia (vida media) "in vivo" de una duración apropiada.

50 La "medición" o "determinación" de la señal de fluorescencia NIR en una región del tumor sólido se efectúa después de la administración del anticuerpo marcado al paciente. O, si se emplea la composición de la invención, después de la administración de la composición del anticuerpo no marcado y del anticuerpo marcado al paciente. La medición puede realizarse en puntos temporales definidos después de la administración, p. ej. 1 día, 2 días o 3 o incluso más días o en cualquier otro momento temporal adecuado para la obtención de una señal comparable de fluorescencia NIR o de una imagen de una región del tumor sólido. Los expertos podrán ajustar la duración de la medición o el punto temporal después de la administración de tal manera que se pueda obtener una señal de fluorescencia NIR o una imagen apropiadas.

60 Para la medición de la fluorescencia NIR pueden emplearse diferentes dispositivos y aplicarse diversas técnicas, p. ej. para los tumores sólidos externos de tipo tumor de mama es apropiado un aparato SoftScan® de la empresa ART Advanced Research Technologies Inc. (<http://www.art.ca/en/products/softscan.html>) (Intes, X., Acad. Radiol. 12, 934-947, 2005). Para las zonas internas afectadas por la enfermedad, por ejemplo el cáncer colorrectal o de pulmón, se pueden aplicar técnicas endoscópicas o una combinación de microcirugía y endoscopia.

65 Un sistema de generación de imágenes para medir la fluorescencia NIR que es útil para la práctica de esta invención incluye por lo general tres componentes básicos: (1) un foco de luz infrarroja próxima, (2) un medio que separe o

distinga las emisiones de fluorescencia de la luz empleada para la excitación del fluorocromo y (3) un sistema de detección.

El foco luminoso proporciona una luz infrarroja próxima monocromática (o sustancialmente monocromática). El foco luminoso puede ser una luz blanca debidamente filtrada, es decir, una luz con un paso de banda de un foco de banda ancha. Por ejemplo, la luz de una lámpara halógena de 150 vatios puede pasarse a través de un filtro de paso de banda comercial, suministrado por ejemplo por la empresa Omega Optical (Brattleboro, VT). En algunas formas de ejecución, el foco luminoso es un láser, véase p. ej. Boas, D.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4887-4891, 1994; Ntziachristos, V. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2767-2772, 2000; Alexander, W., J. Clin. Laser Med. Surg. 9, 416-418, 1991.

Puede emplearse un filtro de paso elevado (700 nm) para separar las emisiones de fluorescencia de la luz de excitación. La empresa Omega Optical suministra como producto comercial un filtro de paso elevado apropiado.

En general, el sistema de detección de la luz puede visualizarse de modo que incluya un componente colector de luz y formador de imágenes y un componente colector de la luz y grabador de imágenes. Aunque el sistema de detección de la luz puede ser un solo dispositivo integrado que incorpore ambos componentes, se van a describir por separado el componente colector de la luz y formador de imágenes y el componente detector de la luz y grabador de imágenes.

Un componente colector de la luz y formador de imágenes especialmente útil es el endoscopio. Para la práctica de la presente invención pueden emplearse los dispositivos y técnicas endoscópicas que se vienen empleando para la generación de imágenes ópticas "in vivo" de numerosos tejidos y órganos, incluidos el peritoneo (Gahlen, J. y col., J. Photochem. Photobiol. B 52, 131-135, 1999), el cáncer de ovarios (Major, A.L. y col., Gynecol. Oncol. 66, 122-132, 1997), el colon (Mycek, M.A. y col., Gastrointest. Endoscopy 48, 390-394, 1998; Pasop, H. y col., Endoscopy 30, 379-386, 1998), conductos biliares (Izuishi, K. y col., Hepatogastroenterology 46, 804-807, 1999), estómago (Abe, S. y col., Endoscopy 32, 281-286, 2000), vejiga (Kriegmair, M. y col., Urol. Int. 63, 27-31, 1999; Riedl, C.R. y col., J. Endourol. 13, 755-759) y cerebro (Ward, H.A., J. Laser Appl. 10, 224-228, 1998).

Otros tipos de componentes colectores de la luz que son útiles para la invención son los dispositivos de tipo catéter, incluidos los dispositivos de fibras ópticas. Tales dispositivos son especialmente apropiados para la generación de imágenes intravasculares, véase p. ej. Tearney, G.J. y col., Science 276, 2037-2039, 1997; Boppart, S.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4256-4261, 1997.

Para la práctica de la presente invención pueden emplearse además otras tecnologías de generación de imágenes, incluida la tecnología de elementos ordenados en fase (phased array technology) (Boas, D.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4887-4891, 1994; Chance, B., Ann. NY Acad. Sci. 838, 29-45, 1998), la tomografía óptica difusa (Cheng, X. y col., Optics Express 3, 118-123, 1998; Siegel, A. y col., Optics Express 4 (1999) 287-298), la microscopía intravital (Dellian, M. y col., Br. LT. Cancer 82, 1513-1518, 2000; Monsky, W.L. y col., Cancer Res. 59, 4129-4135, 1999; Fukumura, D. y col., Cell 94, 715-725, 1998) y la generación de imágenes confocales (Korlach, J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8461-8466, 1999; Rajadhyaksha, M. y col., J. Invest. Dermatol. 104, 946-952, 1995; Gonzalez, S. y col., J. Med. 30, 337-356, 1999).

En esta invención puede emplearse cualquier componente detector de la luz y grabador de imágenes apropiado, p. ej. los sistemas de cargas acopladas (CCD) o las películas fotográficas. La elección del componente detector de la luz y grabador de imágenes dependerá de factores que incluyen el tipo de componentes colector de luz y formador de imágenes que se esté empleando. Los expertos ya saben cómo se realiza la selección de componentes apropiados, el acoplamiento de los mismos en un sistema de formación de imágenes infrarrojas próximas y el manejo de tales sistemas.

Los aparatos útiles para la obtención de una imagen de fluorescencia NIR son p. ej. el aparato SoftScan[®] de la empresa ART Advanced Research Technologies Inc.; la instalación llamada Image Station In-Vivo F; Image Station In-Vivo FX; In-Vivo Imaging System FX Pro de la empresa Molecular Imaging Systems, Carestream Health, Inc. (antiguamente Kodak Molecular Imaging Systems); Aeries[™] Automated Infrared Imaging System y Odyssey Infrared Imaging System[™] de la empresa LI-COR Biosciences; LB 983 NightOWL II de la empresa BERTHOLD TECHNOLOGIES u otros dispositivos adecuados.

Los siguientes ejemplos y figuras se presentan para facilitar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se define en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1

Imágenes de fluorescencia NIR de diferentes tumores sólidos que expresan en exceso y no expresan en exceso a un antígeno tumoral HER2:
en ratones con

- 5 a) modelo BT474 s.c. (subcutáneo), un modelo de tumor que expresa en gran exceso el HER2 (3+ según el ensayo DAKO HercepTest®) (figura 1a),
b) modelo A549 s.c., un modelo de tumor sin expresión excesiva de HER2 (0 según el ensayo DAKO HercepTest®) (figura 1b) y
10 c) ratones sin tumor (figura 1c), a los que se inyecta el pertuzumab marcado con Cy5 por vía i.v. en una sola dosis de 20 microgramos por ratón y se mide la señal de fluorescencia NIR después de 24 h. El tiempo de la medición es de 2 segundos.

15 Las imágenes de la fluorescencia NIR indican: en la figura 1a que i) las células tumorales BT474 expresan en exceso al antígeno tumoral HER2 y ii) que se puede medir una señal de fluorescencia NIR significativa en la región del tumor sólido con respecto a la señal obtenida en el tejido no tumorado; en la figura 1b que i) las células tumorales A549 no presentan una expresión excesiva significativa del antígeno tumoral HER2 y ii) no se puede detectar una señal de fluorescencia NIR significativa en la región del tumor sólido con respecto a la señal procedente del tejido sin tumor; en la figura 1c que i) las células sin tumor de los ratones sin tumor no presentan una expresión excesiva significativa del antígeno tumoral HER2 y ii) no se puede detectar una señal de fluorescencia NIR significativa.

Figura 2

Imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan en exceso al antígeno tumoral HER2

25 En cuatro ratones del modelo KPL4, un modelo tumoral con expresión en fuerte exceso de HER2 (3+ según el ensayo DAKO HercepTest®), se inyecta por vía i.v. el trastuzumab marcado con Cy5 (figura 2a) a dos ratones y se inyecta por vía i.v. el pertuzumab marcado con Cy5 (figura 2b) a otros dos ratones, en cada caso en forma de dosis única de 50 microgramos por ratón y se mide la señal de fluorescencia NIR después de 24 h. El tiempo de detección es de 4 segundos. Las imágenes de fluorescencia NIR indican que i) las células tumorales KPL4 expresan en exceso al antígeno tumoral HER2 y ii) puede medirse una señal de fluorescencia NIR significativa en la región del tumor sólido si se compara con la señal procedente de tejido sin tumor, empleando el trastuzumab marcado con Cy5 (figura 2a) o el pertuzumab marcado con Cy5 (figura 2b).

35 Figura 3

Imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan de modo excesivo el antígeno tumoral HER2 durante el tratamiento de un paciente con trastuzumab no marcado (fase temprana - 48 h después de la primera aplicación de trastuzumab) - uso de pertuzumab marcado con Cy5 (sin reactividad cruzada con el trastuzumab) para la formación de imágenes de fluorescencia NIR

40 En un modelo KPL4, un modelo de tumor que expresa en gran exceso el HER2 (3+ según el ensayo DAKO HercepTest®), en una primera administración se inyecta por vía i.p. el trastuzumab no marcado en una dosis única de 30 mg/kg y 48 h después en una segunda administración se inyecta por vía i.v. el trastuzumab marcado con Cy5 (figura 3a) o el pertuzumab marcado con Cy5 (figura 3b) en cada caso con una dosis única de 50 microgramos por ratón y se mide la señal de fluorescencia NIR pasadas 24 h de la segunda administración. El tiempo empleado para la medición es de 4 segundos. Las imágenes de fluorescencia NIR indican que i) durante el tratamiento con trastuzumab de un tumor sólido que expresa en exceso al antígeno tumoral HER2 (o de un paciente que tiene un tumor sólido que expresa en exceso al antígeno tumoral HER2), el trastuzumab marcado con Cy5 (que incurre en la reacción cruzada con el trastuzumab no marcado) no es apropiado para la detección de una señal significativa de fluorescencia NIR en la región del tumor sólido (figura 3a); ii) durante el tratamiento de un tumor sólido con trastuzumab que expresa en exceso el antígeno tumoral HER2, el pertuzumab marcado con Cy5 (que no presenta reactividad cruzada con el trastuzumab no marcado) es adecuado para detección de una señal significativa de fluorescencia NIR en la región del tumor sólido (figura 3b).

55 Figura 4

60 Imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan en exceso al antígeno tumoral HER2 durante el tratamiento semanal con pertuzumab no marcado (después de la segunda aplicación del pertuzumab) - uso del trastuzumab marcado con Cy5 (no tiene reactividad cruzada con el pertuzumab) para la generación de imágenes de fluorescencia NIR

65 En el modelo KPL-4 se inyecta por vía i.p. el pertuzumab dos veces por semana. La primera inyección (dosis de carga) es de 30 mg/ kg y la segunda aplicación (dosis de mantenimiento) es de 15 mg/kg. Los animales de control reciben solo PBS. Pasadas 48 horas de la segunda administración se inyecta a los ratones de ambos grupos el

trastuzumab marcado con Cy5 y 4 días después se mide la señal de fluorescencia NIR con un tiempo de obtención de 3 segundos. Las imágenes de fluorescencia NIR indican que i) la señal de fluorescencia NIR en los ratones tratados con el pertuzumab (figura 4a) ha disminuido con respecto a la señal de fluorescencia NIR de los ratones tratados con PBS (figura 4b) y ii) por lo tanto en el tumor sólido que expresa en exceso al HER2 puede detectarse una respuesta al tratamiento con pertuzumab que se une de modo específico al HER2.

Figura 5

Formación de imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan al antígeno tumoral EGFR durante el tratamiento con el cetuximab no marcado - uso del rhMab ICR62 marcado con Cy5 (no tiene reactividad cruzada con el cetuximab) para la generación de imágenes de fluorescencia NIR

Se inyecta una vez por semana durante cuatro semanas por vía i.p. a los ratones Balb/c hembra desnudos (= sin pelo y sin timo) que padecen tumores Calu3 una dosis de 2,5 mg/kg de cetuximab. Dos días después del último tratamiento, los ratones reciben 2 mg/kg de rhMab ICR62 marcado con Cy5. Se mide la señal de fluorescencia NIR 24 horas después con un tiempo de detección de 4 segundos. Los resultados demuestran que la inyección previa de cetuximab no marcado permite la ulterior detección de las células tumorales que expresan al EGFR y la localización exacta del tejido tumoral cuando se aplica el rhMab ICR62 marcado con Cy5. Esto indica que el rhMab ICR62 se une a un epítipo que es diferente del epítipo reconocido por el cetuximab y demuestra que el cetuximab y el rhICR62 no presentan reactividad cruzada contra el mismo antígeno tumoral EGFR. Por lo tanto, la imagen de fluorescencia NIR indica que, en el caso de un tumor sólido Calu3 que expresa al EGFR, puede detectarse una respuesta al tratamiento con el cetuximab que se une de modo específico al HER2 y con el rhMab ICR62 marcado con CY5 y que no presenta reactividad cruzada.

Ejemplos

Introducción

En el presente estudio se ha examinado la generación de imágenes de fluorescencia NIR de anticuerpos monoclonales marcados con un marcador de fluorescencia NIR, que se unen de modo específico a un antígeno tumoral, solos o después o durante un tratamiento previo con un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral (dichos anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada) en diferentes modelos de xenograft (injerto ajeno) humano, en los que dicho antígeno tumoral se expresa en exceso o no se expresa en exceso.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular KPL-4 de cáncer de mama humano, cedida gentilmente por J. Kureabashi, se ha establecido a partir de una efusión pleural maligna de una paciente de cáncer de mama que sufría metástasis inflamatoria en la piel, que expresaba en exceso a los receptores del grupo ErbB (Kurebayashi, J. y col., Br. J. Cancer 79, 707-17, 1999). Se cultivan las células tumorales por métodos rutinarios en un medio DMEM (PAA Laboratories, Austria) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (PAA) y 2 mM L-glutamina (Gibco) a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con un 5 % de CO₂. Se realiza el pasaje del cultivo con tripsina / EDTA 1x división (PAA) dos veces por semana. El pasaje celular P6 se emplea para el estudio "in vivo".

De la ATCC se obtiene la línea celular BT474 de cáncer de mama humano, que expresa en exceso al Her2. Se cultivan las células "in vitro" en un medio RPMI 1640 que contiene un 10% de FBS (PAA), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM y Hepes 10 mM a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con un 5 % de CO₂. Se emplean las células del tercer pasaje para la inyección subcutánea de los ratones.

De la DSMZ se obtienen las células de carcinoma pulmonar A549 humano negativo en Her2. Se cultivan las células por métodos estándar aplicando el mismo protocolo que para la línea celular BT474, pero sin la adición del Hepes. El pasaje del cultivo se realiza con tripsina / EDTA 1 x división (PAA) dos veces por semana. Se emplea el pasaje celular P3 para el estudio "in vivo".

De Roche, Kamakura, se obtiene las células de tumor pulmonar Calu3 humano, positivo de EGF-1R. Se cultivan las células "in vitro" en un medio Eagle's MEM con Earle's BSS, un 10% de FCS, piruvato sódico 1 mM y NEAA 0,1 mM a 37°C en una atmósfera saturada de agua con un 5 % de CO₂. Para la inyección subcutánea en los ratones se emplean las células del tercer pasaje.

Animales

En condiciones específicas, libres de patógenos, se mantienen los ratones SCID hembra de color beige (C.B.-17) y los ratones Balb/c hembra desnudos (= sin pelo y sin timo); de 10-12 semanas de edad y de peso corporal 18-20 g (Charles River, Sulzfeld, Alemania) con ciclos diarios de 12 h de luz /12 h de oscuridad con arreglo a las directivas internacionales (GV-Solas; Felasa; TierschG). Después de su llegada se albergan los animales en la sección de

cuarentena de la granja especializada durante una semana para que se acostumbren a su nuevo entorno y al mismo tiempo para someterlos a observación. Se lleva a cabo de modo regular un seguimiento continuo de su salud. Se les facilita pienso (Alltromin) y agua (acidificada a pH 2,5-3) a discreción.

5 Inyección de células tumorales

Se recolectan las células tumorales (tripsina-EDTA) de los matraces de cultivo (Greiner TriFlask) y se transfieren a 50 ml de medio de cultivo, se lavan una vez y se suspenden de nuevo en PBS. Después de un paso adicional de lavado con PBS y filtración (filtro celular; Falcon 100 μ m) se ajusta de modo apropiado la concentración final de las células. Se mezcla con cuidado la suspensión de células tumorales con una pipeta de transferencia para evitar la agregación celular. Se efectúa la anestesia empleando una unidad de inhalación de Stephens para animales pequeños con cámara de preincubación (Plexiglas), máscara nasal individual para los ratones (silicona) e isoflurano (Pharmacia-Upjohn, Alemania) en un sistema cerrado de circulación. Dos días antes de la inyección se afeita el pelaje de los animales.

Se inyectan las células tumorales KPL-4 (3×10^6 en 20 μ l de PBS) por vía ortotópica en la penúltima almohadilla grasa mamaria inguinal derecha (i.m.f.p.) de cada ratón anestesiado. Para este implante ortotópico se inyecta la suspensión celular a través de la piel por debajo del pezón. La inyección de células tumorales corresponde al día 1 del ensayo.

Se inyectan por vía subcutánea las células tumorales BT474 (5×10^6) en 100 μ l de Matrigel (Becton Dickinson) al flanco derecho de los animales. Se facilita como suplemento el 17-beta-estradiol a través del agua de beber. Inicialmente, a partir del día -1 hasta el día 33 del estudio, el agua de beber se suplementa con 2,5 mg de 17-beta-estradiol por ml de agua.

Se inyectan por vía subcutánea las células tumorales A549 (1×10^7 en 100 μ l de PBS) en el flanco derecho de los animales.

Se inyectan por vía subcutánea las células tumorales Calu3 (5×10^6 en 100 μ l de PBS) en el flanco derecho de los animales.

Seguimiento de los síntomas clínicos y del peso corporal

Los animales se controlan a diario para detectar los síntomas clínicos de los efectos adversos. Para el seguimiento a lo largo del ensayo se anota dos veces por semana el peso corporal de los animales.

Obtención de imágenes de fluorescencia NIR

Pueden llevarse a cabo las mediciones no invasivas o la determinación de señales de fluorescencia NIR marcando los anticuerpos monoclonales con marcadores apropiados de fluorescencia NIR. Se marcan p. ej. diferentes anticuerpos monoclonales con un colorante Cy5 o Cy5.5 o Cy7 para hacer el seguimiento de las imágenes de fluorescencia NIR obtenidas de los anticuerpos después la inyección i.v. en los ratones que tienen un tumor sólido y el seguimiento del desarrollo de dichos tumores sólidos y de la expresión de antígenos tumorales que originalmente se expresaban en exceso en dicho tumores durante el tratamiento con anticuerpos no marcados que se unen de modo específico con dicho antígeno tumoral. Las mediciones de fluorescencia NIR se llevan a cabo después de la aplicación de anticuerpos en diferentes puntos temporales, a continuación se emplea un sistema de generación de imágenes de tipo Bon-SAI Imaging System de la empresa Siemens Medizintechnik, Alemania. Sumando las intensidades medias de los píxeles de la región del tumor sólido puede determinarse una señal de fluorescencia NIR específica del tumor sólido en función p. ej. del nivel de expresión del antígeno tumoral, del anticuerpo marcado con cierta imagen de fluorescencia NIR, el tiempo empleado para su obtención, el tiempo después de la aplicación del anticuerpo marcado y el tiempo después de la aplicación del anticuerpo no marcado destinado al tratamiento de dicho tumor sólido, etc.

Resultados

55 Ejemplo 1

Formación de imágenes de fluorescencia NIR de diferentes tumores sólidos que expresan en exceso y no expresan en exceso al antígeno tumoral HER2

Se inyecta por vía i.v. a ratones SCID hembra de color beige que tienen tumores BT474 o A549 una dosis única de 20 μ g/ ratón de pertuzumab en un punto temporal, en el que el tamaño del tumor es aproximadamente de 500 mm³. A los ratones SCID de color beige que no padecen el tumor se les inyecta también el anticuerpo monoclonal marcado y sirven de control. Pasado un día se mide la señal de fluorescencia NIR empleando el sistema BONSAI (Siemens Medizintechnik). El tiempo empleado para la obtención es siempre de 2 segundos. Los resultados se representan en la figura 1a e indican que el anticuerpo monoclonal pertuzumab marcado con Cy5 permite la

detección de las células tumorales BT474 que expresan en exceso al Her2. En cambio, con las células A549 (figura 1b), que no expresan el antígeno Her2, no se puede detectar una señal de fluorescencia NIR y tampoco se consigue generar una señal de fluorescencia NIR en los ratones que no padecen el tumor (figura 1c).

5 Ejemplo 2

Formación de imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan en exceso el antígeno tumoral HER2

10 Se inyecta a ratones SCID hembra de color beige que tienen tumores KPL-4 el trastuzumab marcado con Cy5 (figura 2a) o el pertuzumab marcado con Cy5 (figura 2b). Se inyectan por vía i.v. los anticuerpos marcados en una dosis de 50 µg por ratón. Pasado un día se mide la señal de fluorescencia NIR con un tiempo de obtención de 4 segundos. Los resultados (figura 2) indican que empleando el trastuzumab marcado con Cy5 (figura 2a) o el pertuzumab marcado con Cy5 (figura 2b) se puede detectar una señal comparable de fluorescencia NIR en la línea celular KPL-4 que expresa en exceso al Her2.

15 Ejemplo 3

Formación de imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan en exceso el antígeno tumoral HER2 durante el tratamiento de un paciente con el trastuzumab no marcado (fase temprana - 48 h después de la primera aplicación del trastuzumab) - uso de pertuzumab marcado con Cy5 (sin reactividad cruzada con el trastuzumab) para la formación de imágenes de fluorescencia NIR

25 Se inyecta por vía i.p. a ratones SCID hembra de color beige que tienen tumores KPL-4 una sola dosis de 30 mg/kg de trastuzumab. Pasados dos días, un grupo de ratones recibe el trastuzumab marcado con Cy5 (figura 3a) y a los ratones del segundo grupo se les inyecta el pertuzumab marcado con Cy5 (figura 3b). No hay diferencias significativas en el tamaño del tumor en los dos grupos y se administran los anticuerpos marcados por vía i.v. en una dosis de 50 µg/ ratón. Se mide la señal de fluorescencia NIR al cabo de 24 horas con un tiempo de obtención de 4 segundos. Se mide la señal de fondo es de 500 MFI (intensidad media de la señal de fluorescencia NIR (NIRF) [unidades arbitrarias]) con un tiempo de obtención de 4 segundos. Se cuantifica la intensidad de la fluorescencia NIR sumando el número y las intensidades de señal de los píxeles de la región de interés (ROI). Los resultados demuestran que la inyección previa del trastuzumab no marcado impide la posterior detección significativa de las células tumorales que expresan al Her2, cuando se aplica el trastuzumab marcado con Cy5 ya que se mide una señal de 530 MFI en la región del tumor, que se sitúa muy poco por encima de la señal de fondo de 500 MFI (figura 3a). Por ello no puede detectarse una señal significativa de fluorescencia NIR después del tratamiento previo con trastuzumab, de modo que el trastuzumab marcado con Cy5 no es apropiado para el seguimiento de la terapia durante el tratamiento de un paciente con el trastuzumab. En cambio, la aplicación del pertuzumab marcado con Cy5 (que se une a otro epítipo y no tiene reactividad cruzada con el trastuzumab) proporciona una señal de 1440 MFI en la región del tumor (figura 3b). Por lo tanto se puede detectar una señal significativa de fluorescencia NIR después del tratamiento previo con trastuzumab, de modo que el pertuzumab marcado con Cy5 es adecuado para el seguimiento de la terapia durante el tratamiento con trastuzumab, ya que presenta una relación claramente mejorada de señal / fondo, de 2,88 (= 1440 MFI/ 500 MFI para el pertuzumab marcado con Cy5 después del tratamiento con trastuzumab) si se compara con la relación entre señal y fondo de 1,06 (= 530 MFI/ 500 MFI - para el trastuzumab marcado con Cy5 después del tratamiento con trastuzumab). Esto permite una localización claramente mejor de la región del tumor que cuando se emplean anticuerpos de reactividad cruzada; incluso cuando se administra menor cantidad del anticuerpo NIRF. Los resultados ponen también claramente de manifiesto que el pertuzumab se une a un epítipo diferente del epítipo reconocido por el trastuzumab y por tanto que el trastuzumab y el pertuzumab no presentan reactividad cruzada contra el mismo antígeno tumoral HER2 (mientras que el trastuzumab y el trastuzumab marcado con Cy5 presentan reactividad cruzada y no se puede detectar una señal significativa de fluorescencia NIR después de un tratamiento previo con trastuzumab, de modo que el trastuzumab marcado con Cy5 no es apropiado para el seguimiento de la terapia durante el tratamiento con trastuzumab).

50 Ejemplo 4

Formación de imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan en exceso al antígeno tumoral HER2 durante el tratamiento semanal con pertuzumab no marcado (48 h después de la segunda aplicación de pertuzumab) - uso del trastuzumab marcado con Cy5 (sin reactividad cruzada con el pertuzumab) para la formación de imágenes de fluorescencia NIR

60 Se inyecta el pertuzumab por vía i.p. a ratones SCID hembra de color beige que tienen tumores KPL-4 dos veces por semana. La primera inyección (dosis de carga) es de 30 mg/ kg y la segunda aplicación (dosis de mantenimiento) es de 15 mg/kg (figura 4a). Los animales de control reciben solo PBS (figura 4b). Pasadas 48 horas se inyecta a los ratones de ambos grupos 50 µg/ ratón de trastuzumab marcado con Cy5 y 4 días después se mide la señal de fluorescencia NIR con un tiempo de obtención de 3 segundos. La figura 4a indica que la señal de NIRF de los ratones tratados con pertuzumab es menor que la señal de fluorescencia NIR de los ratones tratados con PBS (figura 4b). Por lo tanto, en el caso del tumor sólido KPL-4 que expresa en exceso al HER2 puede detectarse una respuesta al tratamiento con pertuzumab que se une de modo específico con el HER2.

Ejemplo 5

5 Formación de imágenes de fluorescencia NIR de tumores sólidos que expresan al antígeno tumoral EGFR durante el tratamiento de un paciente con el cetuximab no marcado - uso del rhMab ICR62 marcado con Cy5 (sin reactividad cruzada con el cetuximab) para la formación de imágenes de fluorescencia NIR

10 Se inyecta una vez por semana durante cinco semanas por vía i.p. a los ratones Balb/c hembra desnudos (= sin pelo y sin timo) que padecen tumores Calu3 una dosis de 2,5 mg/kg de cetuximab. Dos días después del último tratamiento, los ratones reciben por vía i.v. 2 mg/kg de rhMab ICR62 marcado con Cy5 (figura 5). Se mide la señal de fluorescencia NIR 24 horas después con un tiempo de detección de 4 segundos. Los resultados demuestran que la inyección previa de cetuximab no marcado permite la ulterior detección de las células tumorales que expresan al EGFR y la localización exacta del tejido tumoral cuando se aplica el rhMab ICR62 marcado con Cy5 (figura 5). Esto indica que el rhMab ICR62 se une a un epítotope que es diferente del epítotope reconocido por el cetuximab y pone de
15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene:

- 5 a) un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral y
 b) un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral,

caracterizada porque, los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque dicho antígeno tumoral se elige entre el grupo formado por el EGFR, HER2/neu, HER3, HER4, Ep-CAM, CEA, TRAIL, receptor 1 de TRAIL, receptor 2 de TRAIL, receptor de linfotoxina-beta, CCR4, CD19, CD20, CD22, CD28, CD33, CD40, CD80, CSF-1R, CTLA-4, proteína de activación de fibroblastos (FAP), hepsina, proteoglicano sulfato de condroitina asociado con el melanoma (MCSP), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor 1 de VEGF, receptor 2 de VEGF, IGF-1R, TSLP-R, TIE-1, TIE-2, TNF-alfa, inductor débil de apoptosis similar al TNF (TWEAK), IL-1R, con preferencia el EGFR, HER2/neu, CEA, CD20 o IGF-1R.

- 20 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal no marcado es un anticuerpo anti-HER2, con preferencia el trastuzumab o el pertuzumab.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal no marcado es un anticuerpo anti-EGFR, con preferencia el cetuximab o una versión humanizada recombinante del anticuerpo ICR62 de rata.

- 25 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal no marcado es un anticuerpo anti-IGF1R.

- 30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, caracterizada porque el anticuerpo monoclonal no marcado se elige entre el grupo formado por: el alemtuzumab, apolizumab, cetuximab, epratuzumab, galiximab, gemtuzumab, ipilimumab, labetuzumab, panitumumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, mapatumumab, matuzumab y pertuzumab, versión humanizada recombinante del anticuerpo ICR62 de rata.

- 35 7. Uso de un anticuerpo monoclonal no marcado que se une de modo específico a un antígeno tumoral para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido que expresa en exceso dicho antígeno tumoral, dicho anticuerpo monoclonal no marcado se co-administra con un segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

- 40 8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque se obtiene una imagen de fluorescencia NIR de dicho paciente.

- 45 9. Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque se mide la señal de fluorescencia NIR de dicho segundo anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral en una región del tumor sólido.

- 50 10. Método no invasivo de obtención una imagen de fluorescencia NIR, en el que se mide la señal de un anticuerpo monoclonal marcado con un marcador de fluorescencia NIR, que se une de modo específico a un antígeno tumoral, en una región de un tumor sólido durante el tratamiento de un paciente que tiene dicho tumor sólido, que expresa en exceso un antígeno tumoral, con un anticuerpo monoclonal que se une de modo específico al mismo antígeno tumoral, caracterizado porque los anticuerpos primero y segundo no presentan reactividad cruzada.

Fig. 1a



Fig. 1b

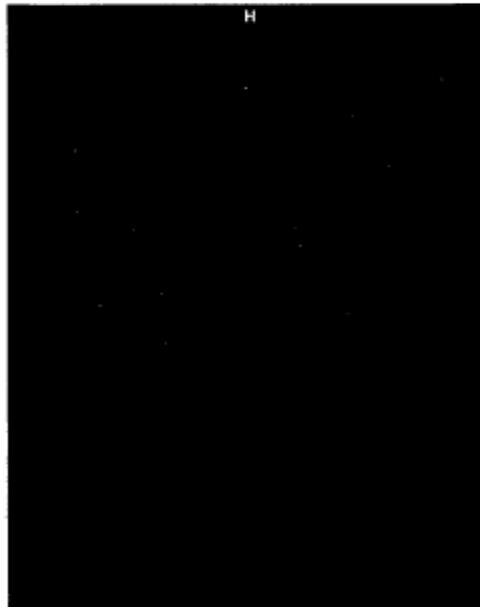


Fig. 1c



Fig. 2a



Fig. 2b



Fig. 3a



Fig. 3b

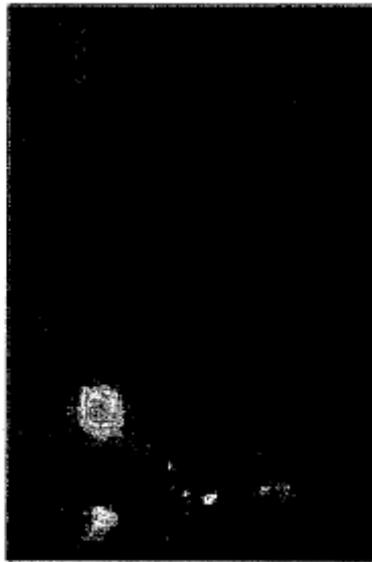


Fig. 4a

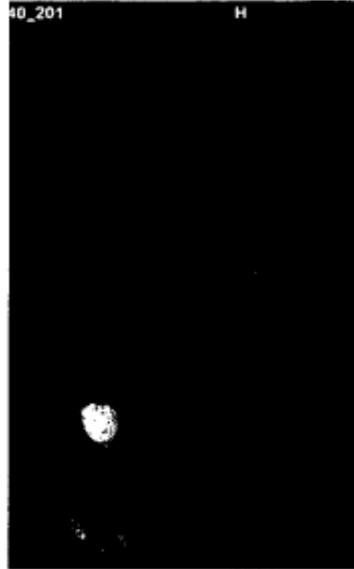


Fig. 4b

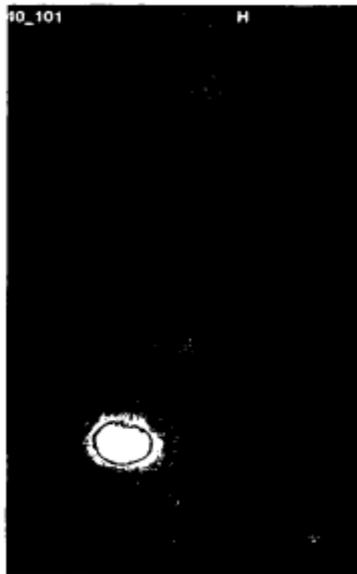


Fig. 5

