(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 797 089**

(51) Int. CI.:

A61K 47/68 (2007.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2016 PCT/EP2016/059336**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174051**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2016 E 16719069 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3288978**

(54) Título: **Anticuerpo IGF-1R y su utilización para el diagnóstico del cáncer**

(30) Prioridad:

27.04.2015 EP 15305644

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2020

(73) Titular/es:

PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt , FR

(72) Inventor/es:

JOUHANNEAUD, ALEXANDRA

(74) Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

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

Anticuerpo IGF-1R y su utilización para el diagnóstico del cáncer

Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a IGF-1R, así como también a las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican dicho anticuerpo.

Antecedentes de la invención

El receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina denominado IGF-1R (o a veces IGF1R) es un receptor con actividad de tirosina cinasa que presenta un 70% de homología con respecto al receptor de insulina IR (IR). IGF-1R es una glucoproteína con peso molecular de aproximadamente 350,000. Es un receptor hetero-tetramérico en el que cada mitad, unida por puentes disulfuro, se compone de una subunidad-α extracelular y de una subunidad-β transmembranaria. La IGF-1R se une a IGF1 e IGF2 con una muy elevada afinidad (Kd #1 nM) pero es igualmente capaz de unirse a la insulina con una afinidad 100 a 1000 veces menor. Por el contrario, IR se une a la insulina con una afinidad muy elevada aunque los IGF únicamente se unen al receptor de insulina con una afinidad 100 veces menor. Los dominios tirosina cinasa de IGF-1R y de IR presentan una homología de secuencia muy elevada, aunque las zonas con homología más débil conciernen respectivamente a la región rica en cisteína situada en la subunidad-α y la parte c-terminal de la subunidad-β. Las diferencias en la secuencia observadas en la subunidad-α se sitúan en la zona de unión de los ligandos y, por lo tanto, en el origen de las afinidades relativas de IGF-1R y de IR para los IGF e insulina, respectivamente. Las diferencias en la porción C-terminal de la subunidad-β dan como resultado una divergencia en las vías de señalización de los dos receptores; IGF-1R que interviene en los efectos mitógenos, de diferenciación y antiapoptóticos, mientras que la activación de la IR implica principalmente efectos a nivel de las vías metabólicas.

La función del sistema IGF en la carcinogénesis se ha convertido en tema de investigación exhaustiva en los últimos 20 años. Este interés surgió tras el descubrimiento del hecho de que además de sus propiedades mitógenas y antiapoptóticas, IGF-1R parece ser necesaria para el establecimiento y mantenimiento de un fenotipo transformado. De hecho, se ha establecido correctamente que una sobreexpresión o una activación constitutiva de IGF-1R conlleva, en una gran variedad de células, una proliferación de las células indistintamente del soporte en medios carentes de suero fetal de ternera, y a la formación de tumores en ratones atímicos. Esto, en sí mismo, no es una propiedad exclusiva ya que una gran variedad de productos de genes sobreexpresados puede transformar las células, incluyendo una gran cantidad de receptores de factores del crecimiento. Sin embargo, el crucial descubrimiento que ha demostrado claramente la principal función desempeñada por IGF-1R en la transformación, ha sido la demostración de que las células IGF-1R^{-}, en donde el gen que codifica IGF-1R se ha desactivado, son totalmente resistentes a la transformación por diferentes agentes que generalmente son capaces de transformar las células, tales como la proteína E5 del virus del papiloma bovino, una sobreexpresión de EGFR o de PDGFR, el antígeno T de SV 40, el Ras activado o la combinación de estos últimos dos factores.

En tal contexto, IGF-1R se ha considerado durante mucho tiempo como una diana interesante en oncología. Se han iniciado una gran cantidad de proyectos que se dirigen a (“targeting”) IGF-1R (anticuerpos humanos o humanizados o moléculas pequeñas) para desarrollar antagonistas de IGF-1R para el tratamiento contra el cáncer y se han realizado más de 70 ensayos clínicos en diversas indicaciones. No obstante, hasta el momento, ninguno de estos proyectos han tenido éxito y no existen anticuerpos IGF-1R en el mercado. Por ejemplo, el documento WO 2007/126876 describe anticuerpos que se unen a IGF-1R y sus utilizaciones, en particular en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. El documento US 2013/084243 divulga un anticuerpo de mamífero, designado como 12B1 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a IGF-1R y pueden utilizarse para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer dependiente de IGF-1R.

Descripción

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualesquier otros aspectos o formas de realización que se exponen en la presente memoria son únicamente informativos.

Se proporciona en la presente memoria por lo menos un reactivo que se puede utilizar como un biomarcador de diagnóstico o pronóstico para detectar y/o monitorizar trastornos oncógenos especialmente los caracterizados por la expresión de IGF-1R o los que están mediados por la expresión de IGF-1R aberrante.

Se ha informado de intentos previos para desarrollar un anticuerpo valioso que pueda usarse como una herramienta relevante de diagnóstico o pronóstico, pero ninguno de estos es satisfactorio.

Como resultará evidente a partir de los siguientes ejemplos, los inventores se han sorprendido al demostrar que los anticuerpos comerciales comúnmente utilizados actualmente para la puntuación de los tumores que expresan IGF-1R parecen no ser relevantes ya que proporcionan falsos positivos y/o falsos negativos. Este problema ha

llevado, en parte, al fracaso de los ensayos clínicos con anticuerpos IGF-1R debido a la selección de los pacientes más que por la actividad real de los anticuerpos IGF-1R.

Además, los primeros estudios realizados usando anticuerpos comerciales mostraron discrepancia entre la puntuación de IGF-1R y la actividad antitumoral de la terapia ADC dirigida (“targeted”).

Se remedia este problema en la presente memoria proporcionando un nuevo anticuerpo que, al contrario que los existentes, es capaz de infiltrarse, lo que correlaciona con la farmacología de la terapia dirigida a IGF-1R.

Un primer aspecto se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al IGF-1R, preferentemente al IGF-1R humano, con elevada afinidad y que así pueda ser útil en métodos para diagnosticar trastornos oncógenos hiperproliferativos patológicos producidos por la expresión de IGF-1R.

Específicamente, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende las seis CDR de las secuencias SEC ID nº 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En una forma de realización particular, la invención se refiere a un anticuerpo IGF-1R o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado por que comprende:

i) una cadena pesada con CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 1, CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2 y CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3; y

ii) una cadena ligera con CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 4, CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5 y CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6.

Los términos "anticuerpo", "anticuerpos", "ab", " o "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales, aislados, manipulados mediante ingeniería genética, químicamente sintetizados, o recombinantes (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de cadena completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes o anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y también fragmentos de anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. En una forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo recombinante.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo IGF-1R" debe ser interpretada como similar a "anticuerpo anti-IGF-1R" y significa un anticuerpo capaz de unirse a IGF-1R.

Mediante los términos "fragmento de unión al IGF-1R" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, se pretende indicar cualquier péptido, polipéptido o proteína que conserve la capacidad de unirse al IGF-1R diana (también comúnmente conocido como antígeno) del anticuerpo. En una forma de realización, se seleccionan tales "fragmentos de unión a antígeno" de entre el el grupo que consiste en fragmentos Fv, scFv (sc para indicar que es monocatenario), Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc o diacuerpos o cualquier fragmento del que hubiera aumentado el tiempo de vida media por modificación química, como la adición de poli(alquilen)glicol como poli(etilen)glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados llamados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, $F(ab')_2$-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" para indicar poli(etilen)glicol), o mediante incorporación en un liposoma, donde tales fragmentos presentan por lo menos una de las características CDR del anticuerpo según la invención. Preferentemente, tales "fragmentos de unión a antígeno" constituirán o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual deriva, tal secuencia parcial es suficiente para conservar la misma especificidad de unión del anticuerpo del cual derivan y una afinidad suficiente, preferentemente de por lo menos igual a 1/100, de una manera más preferida de por lo menos 1/10, de la afinidad del anticuerpo del cual derivan, con respecto a la diana.

Preferentemente, el "fragmento de unión a IGF-1R" o "fragmento de unión a antígeno" comprende por lo menos:

i) CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 1, CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2, y CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3; y

ii) CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 4, CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5, y CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6.

Mediante el término "unión", "se une" o similar, se pretende que el anticuerpo, o cualquier fragmento de unión a antígeno del mismo, forme un complejo con un antígeno que sea relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se puede caracterizar por una constante de disociación en equilibrio de por lo menos aproximadamente $1x10^{-6}$ M o menos. Los métodos para determinar si se unen dos moléculas son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, equilibrio dialítico, resonancia plasmónica superficial, y similares. Para evitar cualquier duda, no significa que dicho anticuerpo no pudiera unirse o interferir, a un bajo nivel, con otro antígeno. No obstante, como una forma de realización, el anticuerpo se une únicamente a dicho antígeno.

Mediante los términos regiones CDR o CDR(s), se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas

pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas como se definen mediante IMGT.

La numeración exclusiva de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables cualquiera que sea el receptor del antígeno, el tipo de cadena o las especies [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997)/Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999)/Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. En la numeración exclusiva de IMGT, los aminoácidos conservados siempre presentan la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1er-CYS), triptófano 41 (TRP-CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2º-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración exclusiva de IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones base estructurales (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Como las separaciones representan posiciones desocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre corchetes y separadas por puntos, por ejemplo [8.8.13]) resultan información crucial. La numeración exclusiva de IMGT es utilizada en representaciones gráficas bidimensionales, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002)/Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)] y en estructuras tridimensionales en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004).

Debe apreciarse que, sin especificación contradictoria en la presente memoria, las regiones determinantes de complementariedad o las CDR, significan las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas como se definen según el sistema de numeración IMGT.

No obstante, las CDR también se pueden definir según el sistema de numeración Kabat (Kabat *et al*., Sequences of proteins of immunological interest, 5ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, y ediciones posteriores). Existen tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera. En la presente memoria, los términos "CDR" y "las CDR" se utilizan para indicar, según el caso, una o más, o incluso todas las regiones que contienen la mayoría de los residuos aminoacídicos responsables de la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno o epítopo que reconoce. A fin de simplificar la lectura de la presente solicitud, no se definen las CDR según Kabat. No obstante, resulta evidente para el experto en la materia, utilizando la definición de las CDR según IMGT, definir las CDR según Kabat.

En una forma de realización particular, el presente anticuerpo IGF-1R se caracteriza por que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 7, o cualquier secuencia con por lo menos un 90% de homología con respecto a la secuencia SEC ID nº 7.

En una forma de realización particular, el presente anticuerpo IGF-1R se caracteriza por que comprende un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 8, o cualquier secuencia con por lo menos 90% de homología con respecto a la secuencia SEC ID nº 8.

Según todavía otra forma de realización, el anticuerpo referido como 810D12, se caracteriza por que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90 %, 95% y 98% de homología después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 7; y/o por que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de homología después de la alineación óptima con la secuencia SEC ID nº 8.

Como se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de homología" entre dos secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos es el porcentaje de nucleótidos o residuos aminoacídicos idénticos entre ambas secuencias que se deben comparar, obtenido después de una óptima alineación, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre ambas secuencias se distribuyen aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos normalmente se lleva a cabo comparando las secuencias después de haberlas alineado óptimamente, tal comparación puede llevarse a cabo por segmentos o mediante una "ventana de alineación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de compararse manualmente, mediante el algoritmo de homologación local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], mediante el algoritmo de homologación local de Neddleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], mediante el método de búsqueda de semejanzas de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:2444] o por medio de programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por el software de comparación BLAST NR o BLAST P). Para la secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de homología con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos incluyen los que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una supresión, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de sustitución de uno o más los aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en donde los aminoácidos sustituidos son reemplazados por aminoácidos "equivalentes". En la presente memoria, la expresión "aminoácidos equivalentes" indica cualquiera de los aminoácidos que es probable que sean sustituidos

por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, sin embargo, las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de los ejemplos específicos definidos a continuación.

Los aminoácidos equivalentes pueden ser determinados ya sea por su homología estructural con los aminoácidos por los cuales son sustituidos o por los resultados de pruebas comparativas de la actividad biológica entre las diversas proteínas de fijación al antígeno que es probable que sean generadas.

Como ejemplo no limitativo, la siguiente tabla 1 resume las posibles sustituciones con probabilidad de llevarse a cabo sin dar como resultado una modificación significativa de la actividad biológica de la correspondiente proteína de fijación al antígeno que se ha modificado; las sustituciones inversas son naturalmente posibles en las mismas condiciones.

Tabla 1

Residuo original	Sustitución(es)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Un aspecto particular es que el anticuerpo, o cualquier fragmento de unión a antígeno del mismo, no se une al receptor de insulina (IR).

En otra forma de realización, el presente anticuerpo consiste en un anticuerpo monoclonal.

El término "anticuerpo monoclonal" o "Mab" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales de la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales presentan una elevada especificidad, siendo dirigidos hacia un solo epítopo. Tal anticuerpo monoclonal se puede producir mediante un solo clon de linfocitos B o de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser recombinantes, es decir, producirse mediante ingeniería proteínica. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de las genotecas de anticuerpos fágicos. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que comúnmente incluyen varios anticuerpos dirigidos contra varios determinantes o epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo epítopo del antígeno. El anticuerpo es aislado u obtenido mediante purificación a partir de fuentes naturales u obtenido mediante recombinación genética o síntesis química.

En otra forma de realización, el presente anticuerpo consiste en un anticuerpo recombinante. El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que resulta de la expresión de ADN recombinante en células vivas. Un anticuerpo recombinante se obtiene mediante métodos de laboratorio de recombinación genética, conocidos por el experto en la materia, creando secuencias de ADN que no se encuentran en organismos biológicos.

En otra forma de realización, el presente anticuerpo consiste en un anticuerpo químicamente sintetizado.

El "anticuerpo IGF-1R" incluye (sin especificación contraria) las formas murinas, pero también las formas quiméricas y humanizadas de dicho anticuerpo IGF-1R.

Para más claridad, la siguiente tabla 2 ilustra las secuencias del anticuerpo 810D12, definidas según IMGT.

Tabla 2

Anticuerpo	Numeración CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID nº
810D12I-4893	IMGT	CDR-H1		1
		CDR-H2		2
		CDR-H3		3
			CDR-L1	4
			CDR-L2	5
			CDR-L3	6
		dominio variable		7
			dominio variable	8

En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal en la presente memoria incluye el anticuerpo murino, quimérico y humanizado. El anticuerpo puede derivar de un hibridoma de origen murino presentado dentro de la colección francesa de cultivos de microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, Paris, Francia), el hibridoma se obtiene mediante la fusión de esplenocitos/linfocitos de ratones inmunizados con Balb/C y de la estirpe de células de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino capaz de secretar un anticuerpo monoclonal divulgado anteriormente, especialmente el hibridoma de origen murino depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, el 17 de septiembre de 2014, con el número I-4893.

El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia en la presente memoria como 810D12, o cualquier fragmento de unión a antígeno del mismo, que es secretado por el hibridoma I-4893 obviamente forma parte de la presente invención.

La invención se refiere a un anticuerpo IGF-1R o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado por que es secretado por el hibridoma presentado en la CNCM, Institut Pasteur, París, el 17 de septiembre de 2014, con el número I-4893.

La invención describe asimismo el hibridoma murino presentado en la CNCM, Institut Pasteur, París, el 17 de septiembre de 2014, con el número I-4893.

Un nuevo aspecto se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado por que se selecciona de entre los siguientes ácidos nucleicos:

a) un ácido nucleico que codifica un anticuerpo como se divulga anteriormente;

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada de entre las secuencias SEC ID nº 9 o 10, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de homología después del alineamiento óptimo con las secuencias SEC ID nº 9 o 10; y

c) un ácido nucleico complementario de los ácidos nucleicos como se define en a) o b).

La tabla 3 a continuación resume las diversas secuencias de nucleótidos relacionadas con el anticuerpo 810D12.

Tabla 3

Anticuerpo	Cadena pesada	Cadena ligera	SEC ID Nº
810D12I-4893	dominio variable		9
		dominio variable	10

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácidos nucleicos", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos", utilizados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia exacta de nucleótidos, modificados o no, que define un fragmento o una región de un ácido nucleico que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es ya sea un ADN bicatenario, un ADN monocatenario, o productos de la transcripción de dichos ADN.

Asimismo debería incluirse que la presente divulgación no se refiere a secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las presentes secuencias han sido aisladas y/o purificadas, es decir, se muestrearon directamente o indirectamente, por ejemplo mediante una copia, donde su entorno ha sido modificado por lo menos parcialmente. Asimismo se deben mencionar los ácidos nucleicos aislados obtenidos mediante técnicas de recombinación genética, mediante, por ejemplo, células hospedadoras, u obtenidos mediante síntesis química.

La invención asimismo se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico como se describe anteriormente.

Se proporcionan particularmente vectores de clonación y/o expresión que contienen tal secuencia de nucleótidos.

Los vectores de la invención contienen preferentemente elementos que permiten la expresión y/o la secreción de secuencias de nucleótidos en una determinada célula hospedadora. Así, el vector debe contener un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como unas regiones reguladoras de la transcripción adecuadas. Debe ser capaz de mantenerse de manera estable en la célula hospedadora y opcionalmente, puede tener señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diversos elementos se seleccionan y optimizan por un experto en la materia de acuerdo con la célula hospedadora utilizada. Para este propósito, las secuencias de nucleótidos pueden insertarse en vectores autorreplicantes en el hospedador seleccionado o pueden ser vectores integrantes del hospedador seleccionado.

Tales vectores son preparados por métodos utilizados típicamente por un experto en la materia y los clones resultantes pueden ser introducidos en un hospedador adecuado por métodos convencionales como lipofección, electroporación, choque térmico o métodos químicos.

Por ejemplo, los vectores son vectores de origen viral o plásmido. Se utilizan para transformar las células hospedadoras con el fin de clonar o expresar las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria.

La invención también comprende células hospedadoras transformadas por o que comprenden un vector como se describe en la presente memoria.

La célula hospedadora puede seleccionarse de entre sistemas procariotas o eucariotas como células bacterianas, por ejemplo, pero también las células de levadura o células de animales, especialmente células de mamífero. También pueden utilizarse células de insectos o vegetales.

La divulgación también se refiere a animales, distintos al hombre, que presentan una célula transformada divulgada en la presente memoria.

Otro aspecto se refiere a un método para la producción de un anticuerpo descrito en la presente memoria, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado por que dicho método comprende las siguientes etapas:

a) el cultivo en un medio de y las condiciones de cultivo adecuadas para una célula hospedadora descrita en la presente memoria; y

b) la recuperación de dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, producido así a partir del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

Dichas células transformadas son de uso en métodos para la preparación de polipéptidos recombinantes descritos en la presente memoria. Los métodos para la preparación de estos polipéptidos en forma recombinante, caracterizados por que dichos métodos usan un vector y/o una célula transformada por un vector descrito en la presente memoria, también están comprendidos en la presente invención. Preferentemente, una célula transformada por dicho vector se cultiva en condiciones que permiten la expresión del polipéptido mencionado anteriormente y la recuperación de dicho péptido recombinante.

Como se ha mencionado anteriormente, la célula hospedadora puede seleccionarse de entre sistemas procariotas o eucariotas. En particular, es posible identificar las secuencias de nucleótidos que facilitan la secreción en dicho sistema procariota o eucariota. De este modo, un vector portador de dicha secuencia puede usarse ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes que se deben secretar. De hecho, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se verá facilitada por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular en lugar de dentro de las células hospedadoras.

La utilización del presente anticuerpo de la invención también se divulga. Los métodos pueden usarse para detectar o diagnosticar diversos trastornos oncógenos hiperproliferativos asociados con la expresión de IGF-1R ejemplificados por, pero no limitados a, cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer endometrial, glioblastoma, colon, cáncer, cáncer gástrico, cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello o cualquier otro cáncer asociado con la expresión de IGF-1R. Como apreciará un experto en la materia, el nivel de expresión de anticuerpo, asociado con un trastorno particular, variará dependiendo de la naturaleza y/o la gravedad de la afección preexistente.

La administración de los presentes anticuerpos en cualquiera de las formas convencionales conocidas por un experto en la materia (por ejemplo, tópica, parenteral, intramuscular, etc.) proporcionará un método extremadamente útil para detectar células displásicas en una muestra así como permitiendo que un clínico controle la pauta posológica terapéutica de un paciente que se somete a tratamiento por un trastorno hiperproliferativo asociado o mediado por la expresión de IGF-1R.

El presente anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, encontrará uso en diversos fines médicos o de investigación, que incluyen la detección, el diagnóstico, el pronóstico y la estadificación de diversas patologías asociadas con la expresión de IGF-1R.

Una forma de realización de la divulgación se refiere al anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describió anteriormente para uso como un agente para la detección de células tumorales que expresan IGF-1R.

Otra forma de realización es el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente, para su utilización en el diagnóstico o el pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de un trastorno oncógeno asociado con la expresión de IGF-1R.

"Diagnosticar" una enfermedad como se usa en la presente memoria se refiere al proceso de identificación o detección de la presencia de un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico asociado con o mediado por la expresión de IGF-1R, control de la progresión de la enfermedad e identificación o detección de células o muestras que son indicativos de un trastorno asociado con la expresión de IGF-1R.

"Pronóstico" como se utiliza en la presente memoria significa la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la predicción del probable desarrollo o resultado de una enfermedad. Por ejemplo, si una muestra de un sujeto es negativa para tinción con el anticuerpo IGF-1R, entonces el "pronóstico" para ese sujeto es mejor que si la muestra es positiva para la tinción de IGF-1R. Las muestras pueden puntuarse para los niveles de expresión de IGF-1R en una escala apropiada, tal como se detalla a continuación.

El anticuerpo IGF-1R puede estar presente en forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo marcado para obtener una señal detectable/cuantificable. Cuando se usa con etiquetas adecuadas u otras biomoléculas o productos químicos detectables apropiados, el anticuerpo IGF-1R es particularmente útil para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico *in vitro* y *en vivo*.

Las etiquetas para uso en inmunoensayos son generalmente conocidas por los expertos en la materia e incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromógenas, que incluyen partículas coloreadas tales como oro coloidal o perlas de látex. Los inmunoensayos adecuados incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Los expertos en la materia conocen diversos tipos de marcadores y métodos para conjugar los marcadores con los anticuerpos IGF-1R, tales como los que se exponen a continuación.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "un trastorno oncógeno asociado con la expresión de IGF-1R" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de altos niveles de IGF-1R (aberrante) en un sujeto que padece el trastorno se ha demostrado que es o es sospechosa de ser responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Alternativamente, dichos trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, mediante un aumento en los niveles de IGF-1R en la superficie celular en las células o tejidos afectados de un sujeto que padece el trastorno. El aumento en los niveles de IGF-1R puede detectarse usando el anticuerpo IGF-1R.

En ciertas formas de realización, "expresión aumentada" en lo que se refiere a IGF-1R se refiere a niveles de proteína o expresión génica que demuestran un aumento estadísticamente significativo en la expresión (medida por expresión de ARN o expresión de proteína) con respecto a un control.

Una forma de realización es un anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente, para su uso en la determinación de si un paciente con un trastorno oncógeno es probable que se beneficie del tratamiento con un inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R, preferentemente un anticuerpo IGF-1R solo, combinado o conjugado.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R" significa cualquier compuesto capaz de disminuir o inhibir la actividad de tirosina cinasa de IGF-1R, ya sea uniéndose al (a los) ligando(s) de IGF-1R o a el IGFR mismo. Los ejemplos de tales inhibidores son proteína, péptidos, anticuerpos o conjugados de anticuerpo-fármaco o cualquier compuesto químico que actúe como antagonistas de IGF-1R, oligonucleótidos antisentido o siARN que inhiban la expresión del gen IGF-1R o de un gen que codifica uno del (de los) ligando(s) IGFR, o cualquier otro fármaco o compuesto conocido por el experto en la materia.

Más particularmente, en el contexto de la presente memoria, el inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R pretende comprender cualquier compuesto o molécula capaz de unirse al IGF-1R e inhibir la unión de su(s) ligando(s).

Todavía más particularmente, en el contexto de la presente memoria, el inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R pretende comprender cualquier anticuerpo monoclonal que se una al IGF-1R.

En otra forma de realización preferida, el inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R consiste en un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en el que la porción (“moiety”) de anticuerpo se dirige al IGF-1R y la porción de fármaco se puede seleccionar de entre cualquier fármaco tal como toxinas citotóxicas, citostáticas, etc. En una forma de realización ejemplificada, la porción de fármaco puede consistir en una auristatina, un análogo o un derivado.

Se describe asimismo en la presente memoria un método para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia y/o la ubicación de las células tumorales que expresan IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente; y

(b) detectar la unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con dicha muestra biológica.

Se proporciona asimismo un método *in vitro* o *ex vivo* para detectar y/o cuantificar y/o determinar el nivel de la expresión de IGF-1R en, preferentemente en la superficie de las células, de un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según la presente invención como se describe anteriormente; y

(b) detectar, y/o cuantificar, y/o determinar el nivel de la unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con dicha muestra biológica.

La unión del anticuerpo IGF-1R puede detectarse y/o cuantificarse y/o determinarse mediante diversos ensayos disponibles para el experto en la materia. Aunque se incluyen dentro de la invención cualesquier medios adecuados para llevar a cabo los ensayos, se pueden mencionar, en particular, la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), ELISA, transferencia western e inmunohistoquímica (IHC). Los métodos preferidos incluyen IHC y FACS.

Se proporciona un método para detectar *in vitro* o *ex vivo* el porcentaje de células tumorales que expresan IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente; y

(b) cuantificar el porcentaje de células que expresan IGF-1R en la muestra biológica.

Otra forma de realización es un método para determinar *in vitro* o *ex vivo* el nivel de expresión de IGF-1R en células tumorales en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente; y

(b) cuantificar el nivel de unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de nivel unión al antígeno del mismo, a IGF-1R en dicha muestra biológica.

Como resultará evidente para el experto en la materia, el nivel de unión del anticuerpo IGF-1R a IGF-1R puede cuantificarse por cualesquier medios conocidos por un experto en la materia. Los métodos preferidos implican el uso de procesos inmunoenzimáticos, tales como ensayos ELISA, inmunofluorescencia, IHC, radioinmunoanálisis (RIA) o FACS.

Según el presente método, el nivel de unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, a IGF-1R se cuantifica mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o inmunohistoquímica (IHC).

Una "muestra biológica" puede ser cualquier muestra que pueda tomarse de un sujeto. Dicha muestra debe permitir la determinación de los niveles de expresión del presente biomarcador. La naturaleza de la muestra dependerá de la naturaleza del tumor.

Las muestras biológicas preferidas incluyen muestras tales como una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de linfa, si el cáncer es un tumor líquido.

Las muestras biológicas preferidas incluyen muestras tales como una muestra de biopsia o una muestra tomada de una terapia de resección quirúrgica, si el cáncer es un tumor sólido.

Preferentemente, la muestra biológica es un fluido biológico, tal como suero, células de sangre completa, una muestra de tejido o una biopsia de origen humano. La muestra puede incluir, por ejemplo, tejido biopsiado, que se puede someter a ensayo convenientemente para la presencia de un trastorno oncógeno patológico asociado con la expresión de IGF-1R.

Una vez que se hace una determinación del nivel de expresión de IGF-1R en las muestras biológicas analizadas, los resultados se pueden comparar con los de las muestras de control, que se obtienen de manera similar a las muestras biológicas analizadas, pero de individuos que no presentan un trastorno oncógeno asociado a la expresión de IGF-1R. Si el nivel de IGF-1R es significativamente elevado en la muestra biológica analizada, se puede concluir que existe una mayor probabilidad de que el sujeto del cual deriva presente o desarrolle dicho trastorno.

Se proporciona en la presente memoria un proceso de diagnóstico o pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de un tumor que expresa IGF-1R, en el que dicho proceso comprende las etapas de (i) determinar el nivel de expresión de IGF-1R mediante un método para determinar *in vitro* o *ex vivo* el nivel de expresión de IGF-1R en células tumorales o en un tumor en un sujeto como se describió anteriormente, y (ii) comparar el nivel de expresión de la etapa (i) con un nivel de expresión de referencia de IGF-1R de tejido normal o un tejido que no expresa IGF-1R.

Con respecto al desarrollo de terapia antitumoral dirigida, el diagnóstico con técnicas inmunohistológicas proporciona información *in situ* sobre el nivel de expresión del receptor y, por lo tanto, permite seleccionar pacientes susceptibles de ser tratados siguiendo el nivel de expresión de los receptores necesarios para dicho tratamiento.

La determinación del estadio tiene un valor de pronóstico potencial y proporciona criterios para diseñar una terapia óptima. Simpson et al., J. Clin. Oncology 18:2059 (2000). Por ejemplo, la selección de tratamiento para tumores sólidos se basa en la estadificación tumoral, que generalmente se realiza mediante la prueba de tumor/nodo/metástasis (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC). Se reconoce comúnmente que, si bien este sistema de prueba y estadificación proporciona información valiosa sobre el estadio en el que se ha diagnosticado el cáncer sólido en el paciente, es impreciso e insuficiente. En particular, no identifica los estadios tempranos de progresión tumoral.

Otra forma de realización consiste en un método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la puntuación IGF-1R de células tumorales o del tumor en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente;

(b) cuantificar, mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o inmunohistoquímica (IHC), el nivel de unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, al IGF-1R en dicha muestra biológica; y

(c) puntuar las células tumorales o el tumor comparando el nivel cuantificado obtenido en la etapa (b) a una escala apropiada sobre la base de dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células con resultado positivo.

En una forma de realización, el anticuerpo IGF-1R es capaz de unirse a IGF-1R cuando las muestras de tejido están fijadas con formalina, fijadas con formol sustituido, fijadas con Glyco-fixx, embebidas y/o congeladas con parafina.

Se puede usar cualquier método convencional de análisis de peligros para estimar el valor pronóstico de IGF-1R. Los métodos de análisis representativos incluyen el análisis de regresión de Cox, que es un método semiparamétrico para modelar datos de supervivencia o tiempo hasta el evento en presencia de casos censurados (Hosmer y Lemeshow, 1999; Cox, 1972). A diferencia de otros análisis de supervivencia, por ejemplo, Life Tables o Kaplan-Meyer, Cox permite la inclusión de variables de predicción (covariables) en los modelos. Usando un método de análisis de convenciones, por ejemplo, Cox se puede ser capaz de probar hipótesis con respecto a la correlación del estado de expresión de IGF-1R en un tumor primario con el tiempo hasta el inicio de cualquiera de las recaídas (tiempo de supervivencia libre de enfermedad o tiempo para enfermedad metastásica) o el tiempo hasta la muerte por la enfermedad (tiempo de supervivencia global). El análisis de regresión de Cox también se conoce como análisis de riesgo proporcional de Cox. Este método es estándar para evaluar el valor pronóstico de un marcador tumoral en el tiempo de supervivencia del paciente. Cuando se usa en modo multivariable, el efecto de varias covariables se prueba en paralelo para poder identificar las covariables individuales que tienen un valor pronóstico independiente, es decir, los marcadores más útiles. El término "estado de IGF-1R" negativo o positivo también puede denominarse [IGF-1R (-)] o [IGF-1R (+)].

Una muestra puede ser "puntuada" durante el diagnóstico o la monitorización del cáncer. En su forma más simple, la puntuación puede ser negativa o positiva categórica según lo juzgado por el examen visual de las muestras por

inmunohistoquímica. Una puntuación más cuantitativa implica juzgar los dos parámetros, la intensidad de la tinción y la proporción de células teñidas ("positivas") que se muestrean.

El "estado de IGF-1R" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la clasificación del tumor a una clase IGF-1R positiva [IGF-1R (+)] o IGF-1R negativa [IGF-1R (-)] basada en la determinación del nivel de expresión del IGF-1R medido por cualquier método tal como inmunohistoquímica (IHC), clasificación de células activadas por fluorescencia FACS u otros métodos conocidos por el experto en la materia.

En una forma de realización, para asegurar la estandarización, las muestras pueden puntuarse para los niveles de expresión de IGF-1R en diferentes escalas, la mayoría de ellas basadas en una evaluación de la intensidad del producto de reacción y el porcentaje de células positivas (Payne et al., Predictive markers in breast cancer – the present, Histopathology 2008, 52, 82-90).

En otra forma de realización, dicha puntuación, particularmente en la etapa (c) del presente método, comprende usar una escala apropiada basada en la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.

Como primer ejemplo, por analogía con la puntuación Quick Allred para la evaluación IHC del receptor de estrógeno y receptor de progesterona, las muestras pueden puntuarse para los niveles de expresión de IGF-1R en una escala global de 0 a 8 combinando puntaciones para la intensidad de reactividad y para la proporción de las células teñidas (Harvey JM, Clarck GM, Osborne CK, Allred DC; J. Clin. Oncol. 1999; 17; 1474-1481). Más particularmente, los primeros criterios de intensidad de reactividad se puntúan en una escala de 0 a 3, 0 correspondiente a "sin reactividad" y 3 correspondiente a "reactividad fuerte". El segundo criterio de proporción reactiva se puntúa en una escala de 0 a 5, 0 correspondiente a "sin reactividad" y 5 a "67-100% de proporción reactiva". La intensidad de la puntuación de reactividad y la proporción de la puntuación reactiva se suman a continuación para producir una puntuación total de 0 a 8. Una puntuación total de 0-2 se considera negativa, mientras que una puntuación total de 3-8 se considera positiva.

Según esta escala, los términos "estado de IGF-1R" negativo o positivo de los tumores o de las células tumorales usados en la presente descripción se refieren a los niveles de expresión de IGF-1R que corresponden a las puntuaciones 0-2 o 3-8 en escala Allred, respectivamente.

La tabla 4 a continuación ilustra las pautas para interpretar los resultados de IHC según el método Allred.

Tabla 4

Intensidad de la inmunorreactividad	**Puntuación 1**	**Proporción reactiva**	**Puntuación 2**
Sin reactividad	0	Sin reactividad	0
Reactividad débil	1	<1%	1
Reactividad moderada	2	1-10%	2
Reactividad fuerte	3	11-33%	3
	-	34-66%	4
	-	67-100%	5
Puntuación total (Puntuación 1 + Puntuación 2)	**Interpretación**		
0-2	Negativo		
3-8	Positivo		

El método se caracteriza por que dicha escala apropiada es una escala de 0 a 8 en la que se puntúa ninguna reactividad 0, y una fuerte reactividad en una proporción de 67-100% de la proporción reactiva se puntúa 8.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, el método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la puntuación de IGF-1R de células tumorales o de un tumor en un sujeto, se caracteriza por que en la etapa (c) la escala apropiada es una escala de 0 a 8 en la que ninguna reactividad se puntúa 0, y una reactividad fuerte en una proporción de 67-100% de la proporción reactiva se puntúa 8.

Es decir, se describe y reivindica un proceso de determinación *in vitro* o *ex vivo* del estado de un tumor o células tumorales de un sujeto, en el que dicho proceso comprende las etapas de:

(a) puntuar un tumor o células tumorales de un sujeto según la escala Allred; y

(b)

-i) determinar que el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 3 a 8; o

-ii) determinar que el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(-)] con una puntuación Allred de 0 a 2.

En un aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 3.

En un aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 4.

En un aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 5.

En un aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 6.

En un aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 7.

En un aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 8.

En otro aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación Allred de 3 a 8.

Otro método particular descrito en la presente memoria para determinar *in vitro* o *ex vivo* el estado IGF-1R de las células tumorales o del tumor en un sujeto, se caracteriza por que comprende las etapas de:

(a) puntuar las células tumorales IGF-1R o el tumor de dicho sujeto según el método de la reivindicación 18; y

(b) determinar que el estado de IGF-1R de las células tumorales o del tumor es [IGF-1R(+)] con una puntuación de 3 a 8; o

(c) determinar que el estado de IGF-1R de las células tumorales o del tumor es [IGF-1R(-)] con una puntuación de 0 a 2.

Como segundo ejemplo, por analogía con la puntuación convencional para la evaluación IHC del receptor HER-2, por ejemplo, las muestras pueden puntuarse para los niveles de expresión de IGF-1R en un método de puntuación algo más simple que integra la intensidad de la tinción (preferentemente tinción membranosa) y la proporción de células que muestran tinción en una escala combinada de 0 a 3+.

En esta escala, a la que se hace referencia como la escala simplificada, 0 y 1+ son negativos, mientras que 2+ y 3+ representan una tinción positiva. Sin embargo, las puntuaciones 1+-3+ pueden ser recodificadas como positivos porque cada puntuación positiva puede asociarse con un riesgo significativamente mayor de recaída y enfermedad mortal en comparación con la puntuación 0 (negativo), pero el aumento de la intensidad entre las puntuaciones positivas puede proporcionar una reducción adicional del riesgo.

En términos generales, los términos "estado de IGF-1R" negativo o positivo de tumores o de células tumorales utilizados en la presente descripción se refieren a niveles de expresión de IGF-1R que corresponden a puntuaciones 0-1+ o 2+ -3+ en la escala simplificada, respectivamente. Solo se debe considerar la reactividad membranosa circunferencial completa del tumor invasivo y con frecuencia se asemeja a una apariencia de "alambre de gallinero". Según las pautas actuales, las muestras puntuadas como límite (puntuación de 2+ o 3+) para IGF-1R se requiere que se sometan a una evaluación adicional. El análisis de IHC debe rechazarse y repetirse o probarse con FISH u otro método si, como ejemplo no limitativo, los controles no son los esperados, los artefactos involucran a la mayoría de la muestra y la muestra tiene una positividad membranosa fuerte de los conductos mamarios normales (controles internos) que sugieren una recuperación excesiva de antígenos.

Para mayor claridad, la tabla 5 a continuación resume estos parámetros.

Tabla 5

Estado de IGF-1R	Descripción IHC
0	Sin reactividad o reactividad membranosa en menos de 10% de las células tumorales
1^+	La reactividad membranosa débil/apenas perceptible se detecta en más de 10% de las células tumorales. Las células son inmunorreactivas solo en parte de la membrana.
2^+	Se observa una débil a moderada reactividad membranosa completa en más de 10% de las células tumorales.
3^+	Se observa una fuerte reactividad completa en más de 10% de las células tumorales.

El presente método se caracteriza por que dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3^+ en la que se puntúa 0

la no reactividad membranosa de las células tumorales y se puntúa una fuerte reactividad completa en más de 10% de las células tumorales 3^+.

Con mayor detalle, como se describe anteriormente, dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3 en la que se puntúa 0 la no reactividad membranosa de las células tumorales; la débil reactividad membranosa perceptible en más de 10% de las células tumorales se puntúa 1+; la reactividad membranosa completa débil a moderada en más de 10% de las células tumorales se puntúa 2+; y una fuerte reactividad completa en más de 10% de las células tumorales se puntúa 3+.

Es decir, se describe y reivindica un proceso de determinación *in vitro* o *ex vivo* del estado de un tumor de células tumorales de un sujeto, en el que dicho proceso comprende las etapas de (a) puntuar un tumor o células tumorales de un sujeto según la escala simplificada como se describe anteriormente; y (b) determinar que el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(+)] con una puntuación de 2+ o 3+; o (c) determinar que el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R(-)] con una puntuación de 0 o 1+.

En un aspecto particular, un tumor o las células tumorales son [IGF-1R(+)] con una puntuación de 2+.

En un aspecto particular, un tumor es, o las células tumorales son [IGF-1R(+)] con una puntuación de 3+.

En un aspecto particular, un tumor es, o las células tumorales son [IGF-1R(+)] con una puntuación de 2+ o 3+.

En otra forma de realización, se proporciona un método para determinar *in vitro* o *ex vivo* el estado de IGF-1R de células tumorales o de un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) puntuar dichas células tumorales IGF-1R o dicho tumor de dicho sujeto según el método descrito anteriormente; y

(b)

-i) determinar que el estado de IGF-1R de las células tumorales o del tumor es [IGF-1R(+)] con una puntuación de 2^+ o 3^+; o

-ii) determinar que el estado de IGF-1R de las células tumorales es [IGF-1R(-)] con una puntuación de 0 a 1^+.

En general, los resultados de una prueba o ensayo se pueden presentar en cualquiera de una variedad de formatos. Los resultados se pueden presentar cualitativamente. Por ejemplo, el informe de la prueba puede indicar solamente si se detectó o no un polipéptido particular, quizás también con una indicación de los límites de detección. Los resultados pueden mostrarse como semicuantitativos. Por ejemplo, se pueden definir varios intervalos, y los intervalos se pueden asignar a una puntuación (por ejemplo, 0 a 3+ o 0 a 8 dependiendo de la escala utilizada) que proporciona un cierto grado de información cuantitativa. Tal puntuación puede reflejar diversos factores, por ejemplo, el número de células en las que se detecta IGF-1R, la intensidad de la señal (que puede indicar el nivel de expresión de las células portadoras de IGF-1R o IGF-1R), etc. Los resultados se pueden mostrar de manera cuantitativa, por ejemplo, como un porcentaje de células en las que se detecta IGF-1R, como una concentración de proteína, etc.

Como apreciará un experto en la materia, el tipo de resultado proporcionado por una prueba variará dependiendo de las limitaciones técnicas de la prueba y la importancia biológica asociada con la detección del polipéptido. Por ejemplo, en el caso de ciertos polipéptidos, un resultado puramente cualitativo (por ejemplo, si el polipéptido se detecta o no a un cierto nivel de detección) proporciona información significativa. En otros casos, es necesario un resultado más cuantitativo (por ejemplo, una proporción del nivel de expresión del polipéptido en la muestra que se prueba frente al nivel normal).

En otro aspecto, se describe un método para diagnosticar un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico o una susceptibilidad a un estado patológico asociado con la expresión de IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) determinar la presencia o ausencia de células portadoras de IGF-1R en una muestra mediante un método para la detección de células que expresan IGF-1R y/o para determinar el nivel de expresión de IGF-1R que se describe anteriormente, y

(b) diagnosticar un estado patológico o susceptibilidad a un estado patológico basado en la presencia o ausencia de dichas células portadoras de IGF-1R.

En los métodos descritos en la presente memoria, la detección de células que expresan IGF-1R o un aumento en los niveles de IGF-1R es generalmente indicativa/o de un paciente con o que se sospecha que presenta un trastorno mediado por IGF-1R.

Se proporciona en la presente memoria un método para predecir el riesgo de que un individuo desarrolle un cáncer, comprendiendo dicho método detectar el nivel de expresión de IGF-1R en una muestra de tejido mediante un método para la detección de células que expresan IGF-1R y/o para determinar el nivel de expresión de IGF-1R descrito anteriormente, en el que un alto nivel de expresión de IGF-1R es indicativo de un alto riesgo de desarrollar un cáncer.

Se proporciona asimismo en la presente memoria un método para evaluar la agresividad tumoral.

La "agresividad tumoral" como se usa en la presente memoria se refiere a un tumor que crece rápidamente y tiende a diseminarse rápidamente.

En una forma de realización, dicho método para evaluar la agresividad tumoral comprende la etapa de:

(a) determinar el nivel de IGF-1R expresado por las células en una muestra de tumor mediante un método para la detección de células que expresan IGF-1R y/o para determinar el nivel de expresión de IGF-1R descrito anteriormente,

(b) determinar el nivel de IGF-1R expresado en una muestra de tejido equivalente tomada del mismo individuo en un momento posterior mediante un método para la detección de células que expresan IGF-1R y/o para determinar el nivel de expresión de IGF-1R descrito anteriormente, y

(c) calcular la proporción entre el nivel de expresión obtenido en la etapa (a) y la proporción obtenida en la etapa (b)

en el que la proporción de expresión de IGF-1R en la muestra tumoral a lo largo del tiempo proporciona información sobre los riesgos de progresión del cáncer.

En una forma de realización preferida, una proporción del nivel obtenido en la etapa (a) al nivel obtenido en el paso (b) superior a 1 indica agresividad. En otra forma de realización, una proporción inferior o igual a 1 indica no agresividad.

Otro aspecto se refiere a monitorizar la expresión de IGF-1R en respuesta a la administración de una terapia dirigida a la ruta de IGF-1R implicando al método para la detección y/o cuantificación de IGF-1R, y/o para determinar el nivel de expresión según la presente invención. Tal monitorización puede ser muy útil cuando dicha terapia desencadena la regulación a la baja y/o la degradación de IGF-1R.

Además, se proporciona en la presente memoria un método para determinar si un trastorno oncógeno es sensible al tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) determinar *in vitro* o *ex vivo* el estado de IGF-1R de las células tumorales de un tumor en un sujeto según el método de puntuación como se describe anteriormente, y

(b) determinar que, si el estado de IGF-1R de las células tumorales o del tumor es IGF-1R(+), el trastorno oncógeno es sensible al tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R.

En particular, la monitorización de la expresión de IGF-1R en la superficie celular podría ser una herramienta fundamental para evaluar la eficacia del tratamiento durante los ensayos clínicos y las terapias "personalizadas".

La aplicación proporciona así unos métodos para determinar la pauta posológica terapéutica apropiada para un sujeto.

Un aumento o una disminución en el nivel de IGF-1R que puede determinarse mediante el método para la detección y/o determinación del nivel de expresión descrito en la presente memoria, es indicativo de la evolución de un cáncer asociado con IGF-1R. Por lo tanto, midiendo un aumento en el número de células que expresan IGF-1R o cambios en la concentración de IGF-1R presente en varios tejidos o células, es posible determinar si una pauta posológica terapéutica particular dirigida a mejorar una malignidad asociada con IGF- 1R es efectiva.

Se proporciona en la presente memoria un método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la eficacia de una pauta posológica terapéutica diseñada para aliviar un trastorno oncógeno asociado con IGF-1R en un sujeto que padece dicho trastorno, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) determinar un primer nivel de expresión de IGF-1R mediante el método para la detección y/o determinación del nivel de expresión descrito en la presente memoria, como se describió anteriormente en una primera muestra biológica, correspondiendo dicha primera muestra biológica a un primer punto temporal de dicho tratamiento;

(b) determinar un segundo nivel de expresión de IGF-1R mediante el método para la detección y/o determinación del nivel de expresión descrito en la presente memoria, como se describe anteriormente en una segunda muestra biológica, correspondiendo dicha segunda muestra biológica a un segundo punto temporal, posterior, de dicho tratamiento;

(c) calcular la proporción de dicho primer nivel de expresión obtenido en la etapa (a) con respecto a dicho segundo nivel de expresión obtenido en la etapa (b); y

(d) determinar que la eficacia de la pauta posológica terapéutica es elevada cuando la proporción de la etapa (c) es superior a 1; o determinar que la eficacia de dicha pauta posológica terapéutica es baja cuando la proporción de la etapa (c) es inferior o igual a 1.

En una forma de realización preferida, dicha pauta posológica terapéutica concebida para aliviar un trastorno oncógeno asociado con IGF-1R en un sujeto que padece dicho trastorno incluye la administración de una terapia que se dirige la ruta de IGF-1R a dicho sujeto.

Se proporciona asimismo en la presente memoria un método *in vivo* de formación de imágenes de un trastorno oncógeno asociado con la expresión de IGF-1R que utiliza el método para la detección y/o determinación del nivel de expresión descrito en la presente memoria. Tal método es útil para localizar *en vivo* las células tumorales, además de monitorizar su invasividad. Asimismo, el método es útil para monitorizar la progresión y/o la respuesta al tratamiento en pacientes previamente diagnosticados con un cáncer mediado por IGF-1R.

Una forma de realización es un método para detectar la ubicación de células tumorales que expresan IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) administrar el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en la presente memoria al sujeto; y

b) detectar la unión de dicho anticuerpo IGF-1R,

en el que la unión indica la presencia de las células tumorales.

En cuanto a la detección de la presencia de un tumor que expresa, se pueden usar muchas técnicas conocidas por un experto en la materia. Sin embargo, los medios preferidos son IHC y FACS.

En otro aspecto, se proporciona un reactivo de formación de imágenes *in vivo*, comprendiendo dicho reactivo el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, estando dicho anticuerpo IGF-1R preferentemente marcado, más preferentemente radiomarcado.

En la presente memoria se contempla asimismo la utilización de dicho reactivo en la formación de imágenes médicas de un paciente que padece un cáncer mediado por IGF-1R.

El presente método comprende las etapas de:

(a) administrar a dicho paciente una cantidad eficaz para formación de imágenes de un reactivo de formación descrito en la presente memoria y

(b) detectar dicho reactivo.

En una forma de realización preferida, el agente de formación de imágenes comprende el presente anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y una porción activa (“active moiety”).

Una "porción activa" como se usa en la presente memoria es un agente que permite la detección *in vivo* de dicho reactivo de formación de imágenes. La porción activa incluye en particular elementos de radio tales como tecnecio-99m (99mTc), cobre-67 (Cu-67), escandio-47 (Sc-47), lutecio-77 (Lu-177) cobre-64 (Cu-64), itrio-86 (Y-86) o yodo-124 (I-124).

El agente de formación de imágenes se administra en una cantidad eficaz para el uso de diagnóstico en un mamífero tal como un ser humano y luego se detecta la localización y la acumulación del agente de formación de imágenes. La localización y la acumulación del agente de formación de imágenes puede detectarse mediante formación de imágenes de radionúclidos, radioescintigrafía, formación de imágenes por resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones, tomografía axial computarizada, rayos X o método de formación de imágenes por resonancia magnética, detección por fluorescencia y detección quimioluminiscente.

Con respecto al desarrollo de terapia antitumoral dirigida, el diagnóstico con técnicas inmunohistológicas

proporciona información *in situ* sobre el nivel de expresión del receptor, por ejemplo, en cuanto al tamaño y/o la ubicación del tumor. El diagnóstico permite así seleccionar pacientes susceptibles de ser tratados siguiendo el nivel de expresión de los receptores necesarios para dicho tratamiento.

Un aspecto particularmente interesante se refiere a un método para seleccionar un paciente con cáncer que se predice que se beneficiará o no de la administración de una cantidad terapéutica de un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) determinar el nivel de expresión de IGF-1R según el método descrito anteriormente;

(b) comparar el nivel de expresión de la etapa anterior (a) con un nivel de expresión de referencia; y

(c) seleccionar el paciente que se predice que se beneficiará de un tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, si la proporción del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia es superior a 1; o

(d) seleccionar el paciente como no predispuesto a beneficiarse de un tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, si la proporción del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia, es inferior o igual a 1.

El nivel de expresión de IGF-1R se compara o mide ventajosamente en relación con los niveles en una célula o muestra de control también denominado "nivel de referencia" o "nivel de expresión de referencia". "Nivel de referencia", "nivel de expresión de referencia", "nivel de control" y "control" se usan indistintamente en la memoria descriptiva. Un "nivel de control" significa un nivel basal separado medido en una celda de control comparable, que generalmente es libre de enfermedad o cáncer. Dicha célula de control puede ser del mismo individuo, ya que, incluso en un paciente con cáncer, el tejido que es el sitio del tumor todavía comprende tejido sano no tumoral. También puede originarse en otro individuo que es normal o que no presenta la misma enfermedad de la que se obtiene la muestra enferma o de prueba. Como se utiliza en la presente memoria, el término "nivel de referencia" se refiere a un "nivel de control" de expresión de IGF-1R usado para evaluar un nivel de prueba de la expresión de IGF-1R en una muestra que contiene células cancerosas de un paciente. Por ejemplo, cuando el nivel de IGF-1R en la muestra biológica de un paciente es mayor que el nivel de referencia de IGF-1R, se considerará que las células tienen un alto nivel de expresión, o sobreexpresión, de IGF-1R. El nivel de referencia puede determinarse mediante una pluralidad de métodos. Los niveles de expresión pueden definir así unas células que portan IGF-1R o, alternativamente, el nivel de expresión de IGF-1R independientemente del número de células que expresan IGF-1R. De este modo, el nivel de referencia para cada paciente puede prescribirse por una proporción de referencia de IGF-1R, en el que la proporción de referencia puede determinarse mediante cualquiera de los métodos para determinar los niveles de referencia descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, el control puede ser un valor predeterminado, que puede adoptar una variedad de formas. Puede ser un único valor de corte, como una mediana o media. El "nivel de referencia" puede ser un solo número, igualmente aplicable a cada paciente individualmente, o el nivel de referencia puede variar, según subpoblaciones específicas de pacientes. Por lo tanto, por ejemplo, los hombres mayores podrían tener un nivel de referencia diferente al de los hombres más jóvenes para el mismo cáncer, y las mujeres podrían tener un nivel de referencia diferente al de los hombres para el mismo cáncer. Alternativamente, el "nivel de referencia" puede determinarse midiendo el nivel de expresión de IGF-1R en células cancerosas no oncógenas a partir del mismo tejido que el tejido de las células neoplásicas que se deben ensayar. Además, el "nivel de referencia" podría ser una cierta proporción de IGF-1R en las células neoplásicas de un paciente con respecto a los niveles de IGF-1R en células no tumorales dentro del mismo paciente. El "nivel de referencia" también puede ser un nivel de IGF-1R de células cultivadas *in vitro*, que puede manipularse para simular células tumorales, o puede manipularse de cualquier otra manera que proporcione niveles de expresión que determinen con precisión el nivel de referencia. Por otro lado, el "nivel de referencia" se puede establecer sobre la base de grupos comparativos, tales como en grupos que no tienen niveles elevados de IGF-1R y grupos que tienen niveles elevados de IGF-1R. Otro ejemplo de grupos comparativos sería grupos que tienen una enfermedad, afección o síntomas particulares y grupos sin la enfermedad. El valor predeterminado puede disponerse, por ejemplo, cuando una población analizada se divide por igual (o de manera desigual) en grupos, tales como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio y un grupo de alto riesgo.

El nivel de referencia también se puede determinar mediante la comparación del nivel de IGF-1R en poblaciones de pacientes que tienen el mismo cáncer. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante un análisis de histograma, en el que se presenta gráficamente una cohorte completa de pacientes, en el que un primer eje representa el nivel de IGF-1R, y un segundo eje representa el número de pacientes en la cohorte cuyas células tumorales expresan IGF-1R en un nivel dado. Se pueden determinar dos o más grupos separados de pacientes mediante la identificación de poblaciones de subgrupos de la cohorte que tienen los mismos o similares niveles de IGF-1R. La determinación del nivel de referencia puede entonces basarse en un nivel que distingue mejor estos grupos separados. Un nivel de referencia también puede representar los niveles de dos o más marcadores, uno de los cuales es IGF-1R. Se pueden representar dos o más marcadores, por ejemplo, mediante una proporción de valores para los niveles de cada marcador.

Asimismo, una población aparentemente sana tendrá un rango "normal" diferente del que tendrá una población que se sabe que tiene una afección asociada con la expresión de IGF-1R. En consecuencia, el valor predeterminado seleccionado puede tener en cuenta la categoría en la que cae un individuo. Se pueden seleccionar rangos y categorías apropiados con no más que experimentación rutinaria por los expertos en la materia. Por "elevado" o "aumentado" se entiende alto en relación con un control seleccionado. Típicamente, el control se basará en individuos normales aparentemente sanos en un grupo de edad apropiado.

También se entenderá que los controles pueden ser, además de valores predeterminados, muestras de materiales ensayados en paralelo con los materiales experimentales. Los ejemplos incluyen tejido o células obtenidos al mismo tiempo del mismo sujeto, por ejemplo, partes de una sola biopsia, o partes de una única muestra de células del sujeto.

En otra forma de realización, se proporciona en la presente memoria una composición farmacéutica para formación de imágenes *in vivo* de un trastorno oncógeno asociado con la expresión de IGF-1R que comprende el anticuerpo IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito anteriormente, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que está marcado y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, también se describe un kit para la detección de células tumorales que expresan IGF-1R en un paciente, caracterizado por que el kit comprende por lo menos el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente, y preferentemente el anticuerpo 810D12.

Los materiales envasados que comprenden una combinación de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico, por ejemplo, kits, también están dentro del alcance de la presente divulgación. El kit contiene los anticuerpos IGF-1R para la detección y la cuantificación de IGF-1R *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA. Cuando el anticuerpo IGF-1R se marca con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloques o amortiguador de lisis) y similares. Tal kit puede comprender un receptáculo que se compartimenta para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, conteniendo dichos recipientes unos elementos separados. Por ejemplo, un recipiente puede contener un primer anticuerpo unido a un vehículo insoluble o parcialmente soluble. Un segundo recipiente puede contener un segundo anticuerpo soluble, marcado detectablemente, en forma liofilizada o en solución. El receptáculo también puede contener un tercer recipiente que contiene un tercer anticuerpo marcado detectablemente en forma liofilizada o en solución. Un kit de esta naturaleza se puede usar en el ensayo en sándwich. La etiqueta o el prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso previsto *in vitro* o diagnóstico.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar unas concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, usualmente liofilizados, que incluyen excipientes que, al disolverse, proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

En otro aspecto adicional, los anticuerpos IGF-1R o fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se detalla en la presente memoria, se proporcionan marcados con una porción detectable, de manera que se pueden empaquetar y usar, por ejemplo, en kits, para diagnosticar o identificar células que tienen el antígeno mencionado anteriormente. Los ejemplos no limitativos de tales marcadores incluyen fluoróforos tales como isotiocianato de fluoresceína; cromóforos, radionúclidos, biotina o enzimas. Tales anticuerpos IGF-1R marcados pueden usarse para la localización histológica del antígeno, ELISA, clasificación de células, así como otras técnicas inmunológicas para detectar o cuantificar IGF-1R, y células que portan este antígeno, por ejemplo.

Se proporciona en la presente memoria un kit, en el que dicho kit se caracteriza por que comprende un anticuerpo IGF-1R o fragmentos de unión al antígeno del mismo, como se describe en la presente memoria.

Se proporciona asimismo un kit, en el que dicho kit se caracteriza por que comprende un anticuerpo IGF-1R quimérico o humanizado o fragmentos de unión al antígeno del mismo, que pueden obtenerse a partir de las 6 CDR que presentan las secuencias SEC ID nº 1 a 6 del anticuerpo IGF-1R o fragmentos de unión al antígeno del mismo..

También se proporcionan kits que son útiles como control positivo para la purificación o inmunoprecipitación de IGF-1R de las células. Para el aislamiento y la purificación de IGF-1R, el kit puede contener el anticuerpo IGF-1R o fragmentos de unión al antígeno del mismo como se detalla en la presente memoria acoplados a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). Se pueden proporcionar unos kits que contienen los anticuerpos para la detección y la cuantificación de IGF-1R *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA. El kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Se pueden incluir recipientes adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes y amortiguadores, anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso deseado *in vitro* o diagnóstico.

Más particularmente, se proporciona un kit para la determinación *in vitro* o *ex vivo* del estado de IGF-1R de células tumorales de un tumor en un sujeto mediante los métodos descritos en la presente memoria. En una forma de realización preferida, como se describirá en el ejemplo, se proporciona un kit para la determinación del estado de IGF-1R de un tumor o de células tumorales por métodos de IHC y/o FACS.

En una forma de realización particular, se proporciona un kit, que comprende por lo menos el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describió anteriormente, estando marcado dicho anticuerpo.

En una forma de realización preferida, el kit comprende además un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R e IGF-1R.

En otra forma de realización preferida, el kit útil para determinar *in vitro* o *ex vivo* el nivel de expresión de IGF-1R en un tumor que expresa IGF-1R, comprende además un reactivo útil para cuantificar el nivel de unión entre dicho anticuerpo marcado IGF-1R y el IGF-1R.

Todavía en otra forma de realización, el kit comprende además: i) un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R marcado e IGF-1R; e ii) unas muestras de control positivas y negativas útiles para la puntuación del nivel de expresión de IGF-1R.

Dicho kit puede comprender además un anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos o para anticuerpos humanos/humanizados, preferentemente dicho anticuerpo policlonal específico para anticuerpos murinos, humanizados o humanos está marcado.

Según una forma de realización particular, el kit para seleccionar *in vitro* un paciente con cáncer que se predice que beneficiará o no se beneficiará de la administración terapéutica de un inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-IR puede comprender: i) un reactivo útil para detectar el grado de unión entre el anticuerpo IGF-1R e IGF-1R; ii) el nivel de control que se ha correlacionado con la sensibilidad a un inhibidor de IGF-1R y/o iii) el nivel de control que se ha correlacionado con la resistencia a un inhibidor de IGF-1R.

Se proporciona asimismo un kit, en el que dicho kit es para determinar si un paciente con un trastorno oncógeno es probable que se beneficie del tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, caracterizado por que dicho kit comprende por lo menos el anticuerpo IGF-1R o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, como se describió anteriormente.

En otra forma de realización, dicho kit de acuerdo se caracteriza por que comprende además

i) un reactivo para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R y el IGF-1R en la superficie de las células tumorales; y/o

ii) un reactivo para cuantificar el nivel de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R y el IGF-1R en la superficie de las células tumorales.

Leyendas de las figuras

Figura 1: representación gráfica de los valores OD obtenidos con el anticuerpo 810D12 en la prueba ELISA de rhIGF1R. El ajuste de datos y la determinación de EC_{50} se determinan usando la aplicación Prism.

Figuras 2A-2C: patrones de inmunohistoquímica (IHC) de reconocimiento del tumor MCF-7 sumergido en parafina con el 810D12 (figura 2A), con anticuerpo anti-IGF-1R G11 (Roche Ventana) fFigura 2B) o anticuerpo anti-IGF-1R AF-305 (R&D system) (figura 2C).

Figura 3: actividad *in vivo* de un ADC anti-IGF-1R en el modelo de xenoinjerto MCF-7.

Figuras 4A-4C: patrones de inmunohistoquímica (IHC) de reconocimiento del tumor SBC-5 sumergido en parafina con el 810D12, con anticuerpo anti-IGF-1R G11 (Roche Ventana) (figura 4B) o anticuerpo anti-IGF-1R AF-305 (R&D system) (figura 4C).

Figura 5: actividad *in vivo* de un ADC anti-IGF-1R en el modelo de xenoinjerto SBC-5.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y selección de 810D12

Los Mab generados contra rhIGF-1R se produjeron y seleccionaron como se describe a continuación.

Se inmunizaron ratones hembra Balb/C mediante inyección subcutánea con 10 µg de proteína IGF-1R humana recombinante (391-GR, R and D Systems) con adyuvante Freund. La inmunización se repitió tres veces a intervalos de 2 semanas. La cuarta inyección se realizó mediante inyección intraperitoneal en presencia de adyuvante.

Tres días después, las células del bazo se fusionaron con células de mieloma SP2OAg14 con PEG al 50%. Después de 14 días de selección metabólica HAT, los sobrenadantes del hibridoma se analizaron mediante FACS usando células MCF7 humanas de cáncer de mama. Solo se mantuvieron los anticuerpos de unión a MCF7.

Los anticuerpos de interés se clonaron a continuación mediante dilución de límites. Ocho días después de la clonación, los sobrenadantes se seleccionaron nuevamente mediante FACS usando células MCF7. Se mantuvieron tres clones positivos para cada hibridoma. La isotipificación de los anticuerpos secretados se determina usando el kit HRP del sistema de clonotipificación SBA de Southern Biotechnologies (Cat: 5300-05). Finalmente, un clon se expande y congela.

Posteriormente se realizaron otras caracterizaciones del anticuerpo 810D12 usando sobrenadantes de hibridoma tales como rhIGF-1R o rmIGF-1R o rhIR mediante ELISA. En todos los ELISA directos, las proteínas de interés se inmovilizaron (1 µg/ml) en el fondo de cada pocillo. Después de la saturación, se añadieron sobrenadantes de hibridoma a los pocillos. Después de un período de incubación de 1 hora y una etapa de lavado, se usó para detección una solución de anticuerpo policlonal marcado con IgG de cabra anti-ratón, antes de la adición del sustrato TMB. La reacción se detuvo con una solución de 1M H_2SO_4 antes de leer la DO con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm. En la siguiente tabla 6 se presentan los datos.

Tabla 6

Valores OD obtenidos a 5µg/ml mediante ELISA			
	Recubrimiento rhIGF1R	**Recubrimiento rmIGF1R**	**Recubrimiento rhIR**
810D12	2.136	0.053	0.048
CTRL Positivo	2.338	1.293	1.077
CTRL negativo	0.055	0.065	0.048

En la figura 1 se presenta la curva de respuesta a la dosis para el anticuerpo 810D12 en el recubrimiento rhIGF-1R. Los valores de EC_{50} se determinan usando la aplicación Prism.

Los datos mostraron que el anticuerpo 810D12 solo reconoce el rh IGF-1R con un EC_{50} de 0.51 nM. No se une a la forma murina del IGF-1R ni al IR humano.

Ejemplo 2: Evaluación de la correlación de la estadificación con el presente anticuerpo y la actividad de un ADC que se dirige a IGF-1R en el modelo de xenoinjerto MCF-7.

Para correlacionar la clasificación de los tumores con la farmacología, los tumores se han clasificado (sección 2.1) y luego se han realizado experimentos *in vivo* en el modelo de xenoinjerto MCF-7 con un ADC que comprende una porción de anticuerpo que se dirige a IGF-1R conocido por ser internalizado y una porción de fármaco que consiste en una auristatina (sección 2.2).

2.1: Detección inmunohistoquímica de la expresión de IGF-1R en el modelo de xenoinjerto MCF-7.

Las secciones de tejido del xenoinjerto MCF-7 se desparafinaron, rehidrataron y colocaron en un amortiguador de recuperación de objetivo 1X (Dako S1699) en un baño de ebullición precalentado a 98°C para la recuperación del epítopo inducido por calor a 98°C durante 40 minutos y luego 20 minutos adicionales en el amortiguador de recuperación del objetivo. Después de 3 lavados en amortiguador Tris de solución salina al 0.05% Tween 20 (TBS-T) (Dako S3006), la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó utilizando reactivo bloqueador de peroxidasa (Dako K4007) durante cinco minutos. Las secciones se lavaron con TBS-T e incubaron un reactivo de bloqueo (UltraV block-TA-125UB-LabVision) durante 5 minutos antes de la incubación con el anticuerpo monoclonal 810D12 (a 5 µg/ml) o IgG1/kappa de ratón (5µg/ml, X0931, Dako) como control negativo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron con TBS-T y se incubaron con Envision (Dako) durante 30 minutos. Se usó diaminobencidina para el desarrollo de un producto de reacción color marrón (Dako K3468). Los portaobjetos se sumergieron en hematoxilina durante 2 minutos para tinción de contraste (Dako S3309).

El anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R 810D12 tiñe de manera diferencial la membrana celular de MCF-7. En este procedimiento IHC, el producto de reacción marrón correlaciona con la tinción positiva de la membrana celular y la falta de producto de reacción marrón correlaciona con la tinción negativa y sin visualización de la membrana celular. Utilizando un algoritmo membranoso, la puntuación para la tinción de las células tumorales MCF-7 fue de 3+ (figura 2A). Usando anticuerpos anti-IGF-1R de anticuerpo G11 (Roche Ventana) o AF-305 (R&D System), la sección del

mismo tumor se puntuó 2+ (figuras 2B y 2C, respectivamente).

2.2: Actividad *in vivo* de un ADC anti-IGF-1R en el modelo de xenoinjerto MCF-7.

El ADC anti-IGF-1R ha sido evaluado *in vivo*, en el modelo de xenoinjerto MCF-7.

Todos los procedimientos con animales fueron realizados según las normas de la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. El protocolo fue aprobado por el Animal Ethical Committee del Pierre Fabre Institute. Cinco millones de células MCF-7 fueron inyectadas subcutáneamente en ratones desnudos/Swiss de 7 semanas de edad. Antes de la inyección de la célula, se implantaron gránulos de estrógeno (Innovative Research of America) en el costado izquierdo a los ratones para liberar estrógenos necesarios para el crecimiento *in vivo* de tumores de MCF-7.

Veinte días después de la implantación de células MCF-7, cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 120-150 mm^3, los animales fueron divididos en grupos de 6 ratones según el tamaño del tumor y su aspecto. Se inoculó ADC anti-IGF-1R mediante inyecciones intraperitoneales durante un ciclo de 6 inyecciones cada cuatro días (Q4d4). El estado de salud de los animales fue supervisado diariamente. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana con una pinza calibradora electrónica hasta el final del estudio. El volumen tumoral se calcula con la siguiente fórmula: π/6 x longitud x anchura x altura. La toxicidad se evaluó siguiendo el peso de los animales tres veces por semana. Se realizaron análisis estadísticos en cada medición utilizando una prueba de Mann-Whitney.

La inyección de ADC anti-IGF-1R inhibió significativamente e incluso indujo una regresión completa del crecimiento tumoral (figura 3) como se esperaba para un tumor clasificado 3+ pero no para un tumor clasificado 2+.

Ejemplo 3: Evaluación de la correlación de la estadificación con el presente anticuerpo y la actividad de un ADC que se dirige a IGF-1R en el modelo de xenoinjerto SBC-5.

Para correlacionar la clasificación de los tumores con la farmacología, los tumores se han clasificado (sección 3.1) y luego se han realizado experimentos *in vivo* en el modelo de xenoinjerto SBC-5 con un ADC que comprende una porción de anticuerpo que se dirige a IGF-1R y una porción de fármaco que consiste en una auristatina (sección 3.2).

3.1 Detección inmunohistoquímica de la expresión de IGF-1R en el modelo de xenoinjerto SBC-5.

El nivel de IGF-1R se analizó utilizando el mismo protocolo descrito en la sección 2.1 del ejemplo 2 anterior.

Cuando se detectó IGF-1R con el 810D12, se detectaron niveles bajos (1+), (figura 4A). Cuando se detectó IGF-1R con anticuerpo G11 (Roche Ventana) o anticuerpos anti-IGF-1R de AF-305 (R&Dsystem), las secciones del mismo tumor se puntuaron 3+ (figuras 4B y 4C, respectivamente).

3.2: Actividad *in vivo* de un ADC anti-IGF-1R en el modelo de xenoinjerto SBC-5.

El ADC anti-IGF-1R ha sido evaluado *in vivo*, en el modelo de xenoinjerto SBC-5.

Todos los procedimientos con animales fueron realizados según las normas de la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos. El protocolo fue aprobado por el Animal Ethical Committee del Pierre Fabre Institute. Cinco millones de células SBC-5 fueron inyectadas subcutáneamente en ratones atímicos de 7 semanas de edad. Doce días después de la implantación de células, cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 150 mm^3, los animales fueron divididos en grupos de 6 ratones según el tamaño del tumor y su aspecto. Se inoculó ADC anti-IGF-1R mediante inyecciones intraperitoneales durante un ciclo de 6 inyecciones cada cuatro días (Q4d6). El estado de salud de los animales fue supervisado diariamente. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana con una pinza calibradora electrónica hasta el final del estudio. El volumen tumoral se calcula con la siguiente fórmula: π/6 x longitud x anchura x altura. La toxicidad se evaluó siguiendo el peso de los animales tres veces por semana. Se realizaron análisis estadísticos en cada medición mediante una prueba de Mann-Whitney.

La progresión del tumor de las células tumorales SBC-5 no resultó afectada por la inyección de ADC anti-IGF-1R. (Figura 5) como se esperaba para un tumor clasificado 1+ pero no para un tumor clasificado 3+.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
JOUHANNEAUD, Alexandra

<120> NUEVO ANTICUERPO IGF-1R Y SU UTILIZACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER

<130> B370155D34867

<150> EP 15305644.5
<151> 2015-04-27

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena pesada, CDR-H1

<400> 1
Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr Met
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena pesada, CDR-H2

<400> 2
Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr
1 5

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena pesada, CDR-H3

<400> 3
Val Thr Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena ligera, CDR-L1

<400> 4
Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
1 5

<210> 5
<211> 3

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena ligera, CDR-L2

<400> 5
Tyr Thr Ser
1

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena ligera, CDR-L3

<400> 6
Gln Gln Gly Tyr Ser Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena pesada, dominio variable

<400> 7
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Met Leu His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Thr Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena ligera, dominio variable

<400> 8

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Val Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Asn Leu Glu Gln
65                  70                  75                  80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Leu Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 9
<211> 363
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena pesada, dominio variable

<400> 9

```
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg       60

tcctgcaagg cttctggaca cacattcact agctatatgc tgcactgggt gaagcagaag      120

cctgggcagg gccttgagtg gcttggattt attaatcctt acaatgatgt tactaagtac      180

aatgagaact tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac      240

atggagctca acagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgt aactaccgcc      300

tactatggta acggccggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc      360

tca                                                                    363
```

<210> 10
<211> 321
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> 810D12 I-4893, cadena ligera, dominio variable

<400> 10

```
gatatccaga tgacacagac tacatcttcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc       60

atcagttgca gggcaagtca ggacattacc aattatttaa cctggtatca gcagaaacca      120

gatggaactg ttaaagttct gatctactac acatcaagat tatactcagg agtcccatca      180

aggttcagtg gcagtgggtc tggatcagat tattctctca ccattaacaa cctggagcaa      240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggttattcgc ttccgtggac gttcggtgga      300

ggcaccaagc tggaaatcaa a                                                321
```

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo IGF-1R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado por que comprende:

i) una cadena pesada con CDR-H1 de la secuencia SEC ID nº 1, CDR-H2 de la secuencia SEC ID nº 2 y CDR-H3 de la secuencia SEC ID nº 3; y

ii) una cadena ligera con CDR-L1 de la secuencia SEC ID nº 4, CDR-L2 de la secuencia SEC ID nº 5 y CDR-L3 de la secuencia SEC ID nº 6.

2. Anticuerpo IGF-1R según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende un dominio variable de cadena pesada de la secuencia SEC ID nº 7 y/o un dominio variable de cadena ligera de la secuencia SEC ID nº 8.

3. Anticuerpo IGF-1R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado por que es secretado por el hibridoma presentado en la CNCM, Institut Pasteur, París, el 17 de septiembre de 2014, con el número I-4893.

4. Anticuerpo IGF-1R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización como un agente para la detección de células tumorales que expresan IGF-1R o para determinar el nivel de expresión de células tumorales que expresan IGF-1R.

5. Anticuerpo IGF-1R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización en el diagnóstico o pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de un trastorno oncógeno asociado con la expresión de IGF-1R.

6. Anticuerpo IGF-1R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su utilización en la determinación de si un paciente con un trastorno oncógeno es probable que se beneficie del tratamiento con un inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R, preferentemente un anticuerpo IGF-1R solo, combinado o conjugado.

7. Método para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia y/o la ubicación de las células tumorales que expresan IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

(b) detectar la unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con dicha muestra biológica.

8. Método para detectar *in vitro* o *ex vivo* el porcentaje de células tumorales que expresan IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

(b) cuantificar el porcentaje de células que expresan IGF-1R en la muestra biológica.

9. Método para determinar *in vitro* o *ex vivo* el nivel de expresión de IGF-1R en células tumorales en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

(b) cuantificar el nivel de unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, a IGF-1R en dicha muestra biológica.

10. Método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la puntuación IGF-1R de células tumorales o de un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;

(b) cuantificar mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o inmunohistoquímica (IHC) el nivel de unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, a IGF-1R en dicha muestra biológica; y

(c) puntuar las células tumorales o el tumor comparando el nivel cuantificado obtenido en la etapa (b) a una

escala apropiada sobre la base de dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.

11. Método para determinar si un trastorno oncógeno es sensible al tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) determinar *in vitro* o *ex vivo* el estado de IGF-1R de las células tumorales o de un tumor de un sujeto según el método según la reivindicación 10, y

(b) determinar que, si el estado de IGF-1R de las células tumorales o del tumor es IGF-1R(+), el trastorno oncógeno es sensible al tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R.

12. Método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la eficacia de una pauta posológica terapéutica concebida para aliviar un trastorno oncógeno asociado con IGF-1R en un sujeto que padece dicho trastorno, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) determinar un primer nivel de expresión de IGF-1R según la reivindicación 9 en una primera muestra biológica, correspondiendo dicha primera muestra biológica al primer punto temporal de dicho tratamiento;

(b) determinar un segundo nivel de expresión de IGF-1R según la reivindicación 9 en una segunda muestra biológica, correspondiendo dicha segunda muestra biológica a un segundo punto temporal, posterior, de dicho tratamiento;

(c) calcular la proporción de dicho primer nivel de expresión obtenido en la etapa (a) con respecto a dicho segundo nivel de expresión obtenido en la etapa (b); y

(d) determinar que la eficacia de dicha pauta posológica terapéutica es elevada cuando la proporción de la etapa (c) es superior a 1; o determinar que la eficacia de dicha pauta posológica terapéutica es baja cuando la proporción de la etapa (c) es inferior o igual a 1.

13. Método para seleccionar un paciente con cáncer que se predice que se beneficia o no de la administración de una cantidad terapéutica de un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) determinar el nivel de expresión de IGF-1R según el método según la reivindicación 9;

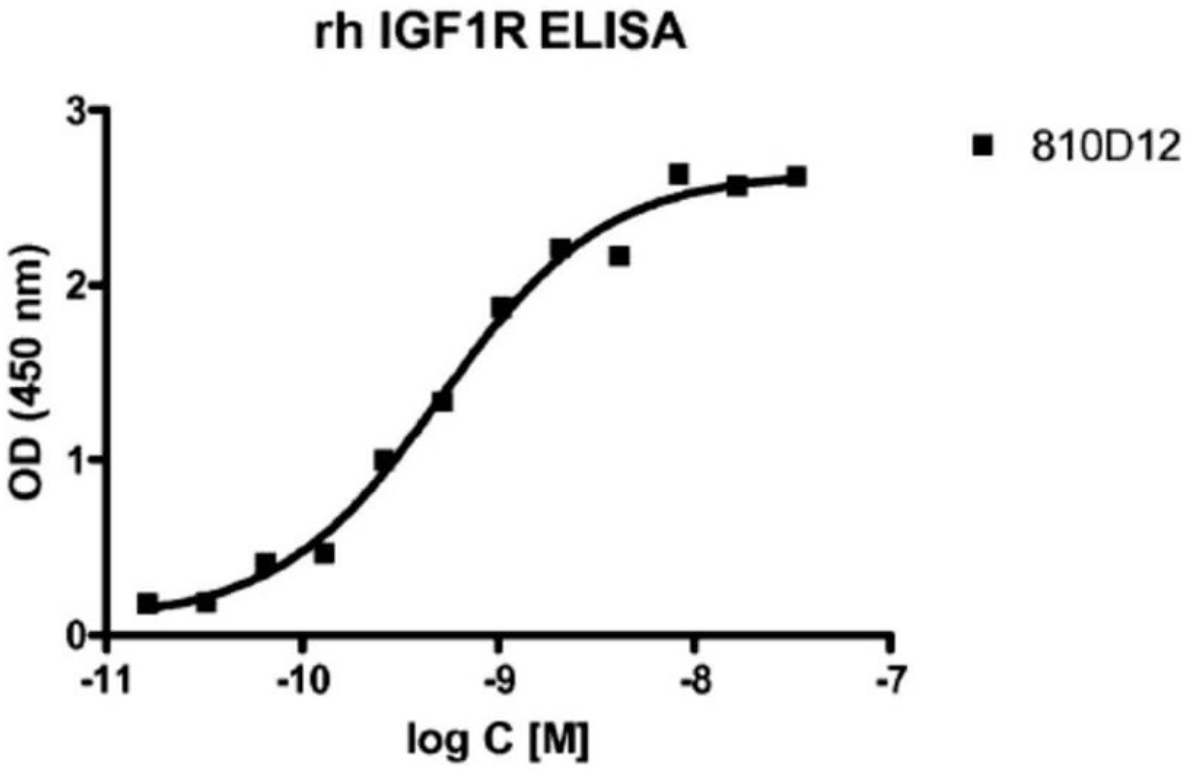
(b) comparar el nivel de expresión de la etapa anterior (a) con un nivel de expresión de referencia; y

(c) seleccionar el paciente como que se predice que se beneficia de un tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, si la proporción del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia es superior a 1; o

(d) seleccionar el paciente como que no se predice que se beneficia de un tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, si la proporción del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia es inferior o igual a 1.

14. Kit para la detección de células tumorales que expresan IGF-1R en un paciente, caracterizado por que dicho kit comprende por lo menos el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

15. Kit para determinar si un paciente con un trastorno oncógeno es probable que se beneficie del tratamiento con un fármaco de anticuerpo que se dirige a la ruta de IGF-1R, caracterizado por que dicho kit comprende por lo menos el anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.



	810D12
Dosis-respuesta sigmoidea (inclinación variable)	
Valores de ajuste óptimo	
PARTE INFERIOR	0.08071
PARTE SUPERIOR	2.641
LOGE50	-9.290
INCLINACIÓN DE ASCENSO	1.041
EC50	5.127e-010

FIGURA 1

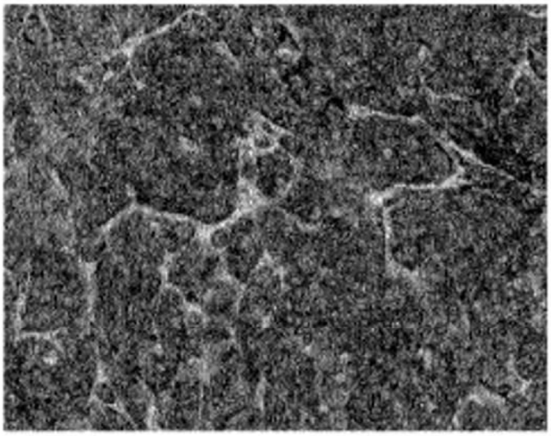


FIGURA 2A

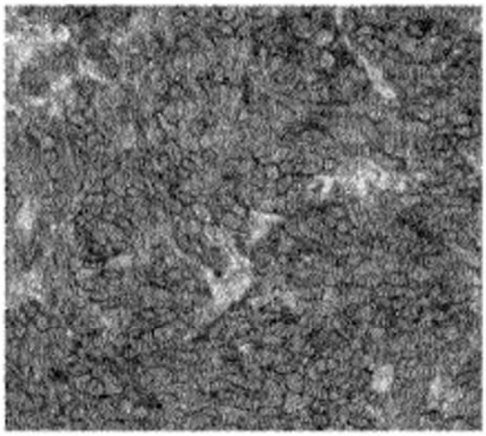


FIGURA 2B

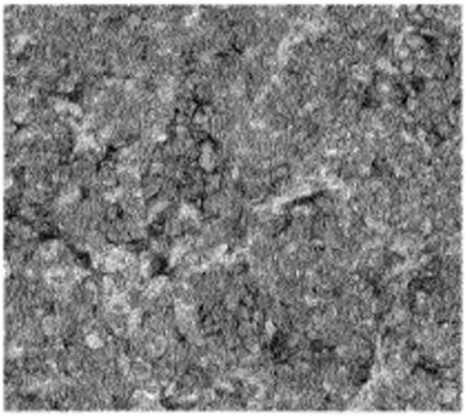


FIGURA 2C

FIGURAS 2A-2C

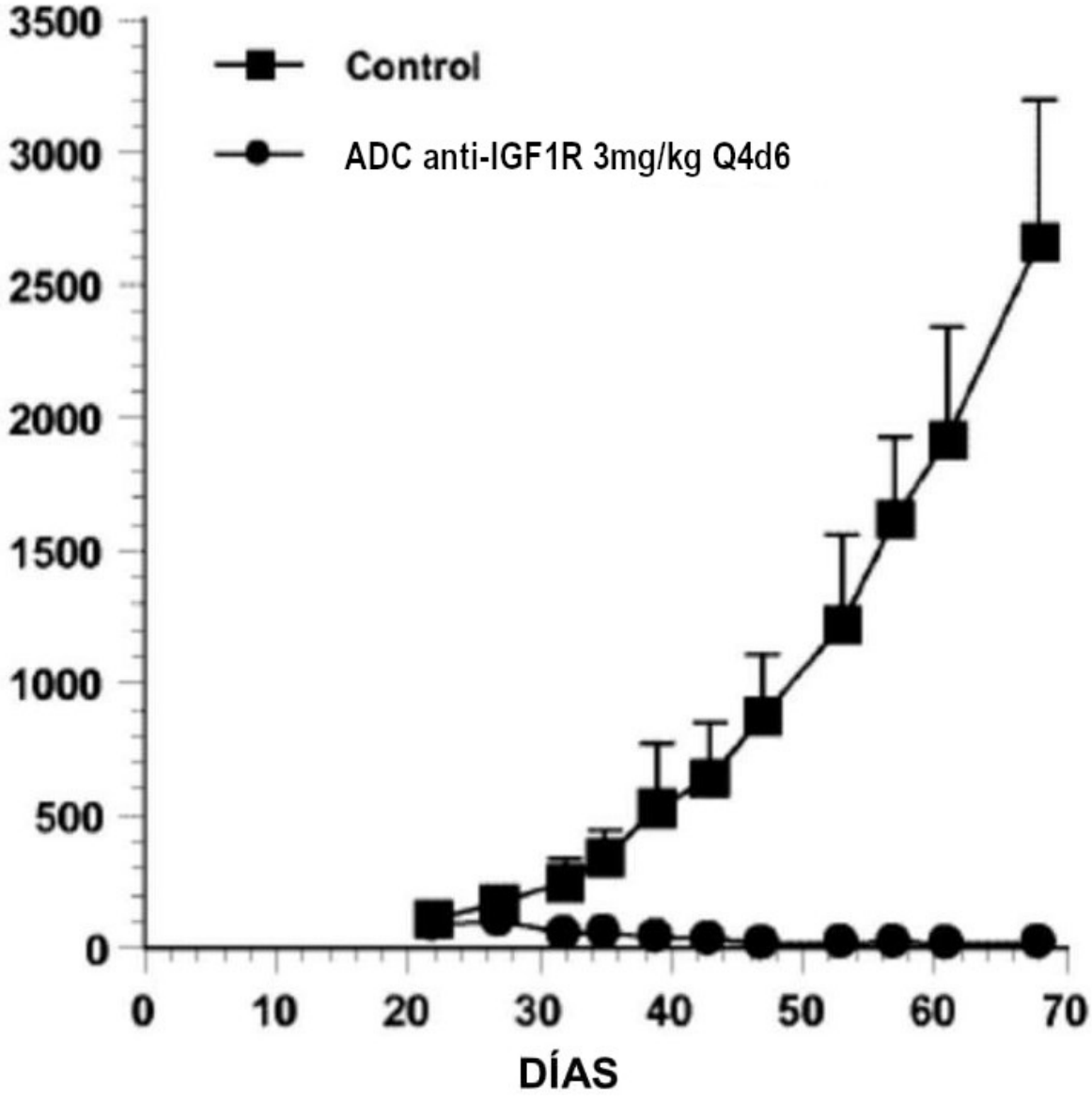

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
ADC anti-IGF1R 3mg/kg Q4d6
0
10
20
30
40
50
60
70
DÍAS

FIGURA 3

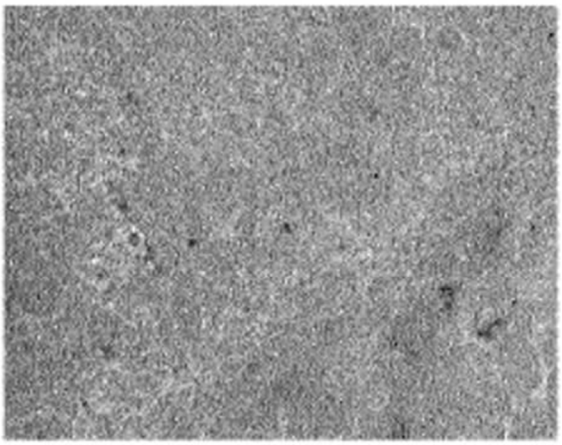


FIGURA 4A

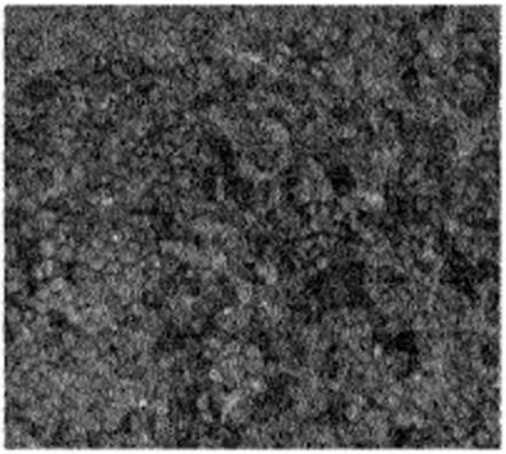


FIGURA 4B

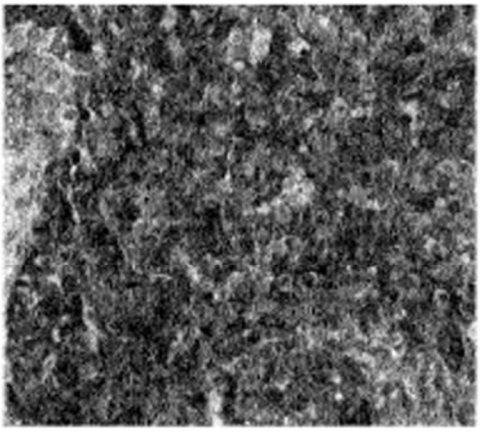


FIGURA 4C

FIGURAS 4A-4C

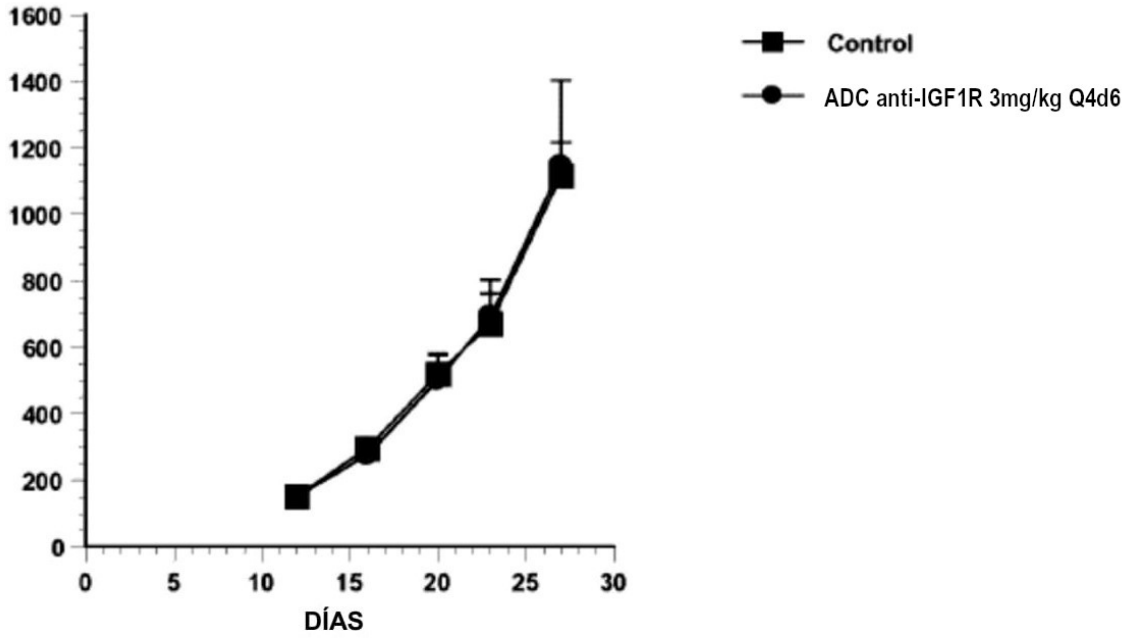

1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
DÍAS
Control
ADC anti-IGF1R 3mg/kg Q4d6

FIGURA 5