

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 753**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2016 PCT/EP2016/059338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2016 E 16722812 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.03.2021 EP 3288979**

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

30 Prioridad:

**27.04.2015 EP 15305642**

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

**11.11.2021**

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.**

ES 2 875 753 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

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

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, apto para unirse a IGF-1R, así como a las secuencias de ácido nucleico o aminoácido que codifican dicho anticuerpo.

### 10 **Antecedentes de la invención**

El receptor del factor de crecimiento análogo a la insulina tipo 1 denominado IGF-1R (o, en ocasiones IGF1R) es un receptor con actividad de tirosina cinasa que presenta un 70% de homología con el receptor de la insulina IR. El IGF-1R es una glicoproteína de un peso molecular de aproximadamente 350,000. Es un receptor heterotetramérico del cual cada mitad -que está ligada por medio de puentes disulfuro- está compuesta por una subunidad- $\alpha$  extracelular y una subunidad- $\beta$  transmembranaria. El IGF-1R se une a IGF1 e IGF2 con una afinidad muy alta (Kd #1 nM) pero es igualmente capaz de unirse a la insulina con una afinidad 100 hasta 1000 veces menor. Por el contrario, el IR se une a la insulina con una afinidad muy alta, a pesar de que los IGF se unan únicamente al receptor de la insulina con una afinidad 100 veces menor. El dominio de la tirosina cinasa del IGF-1R y del IR presenta una homología de secuencia muy alta, aunque las zonas con una homología más débil se refieren, respectivamente, a la región rica en cisteína localizada en la subunidad- $\alpha$ , y a la porción C-terminal de la subunidad- $\beta$ . Las diferencias de secuencia observadas en la subunidad- $\alpha$  están situadas en la zona de unión de los ligandos y, por lo tanto, están en el origen de las afinidades relativas del IGF-1R y del IR para los IGF y para la insulina, respectivamente. Las diferencias en la porción C-terminal de la subunidad- $\beta$  dan como resultado una divergencia en las vías de señalización de los dos receptores; IGF-1R que media los efectos mitógenos, de diferenciación y antiapoptosis, mientras que la activación del IR implica, principalmente, efectos a nivel de las vías metabólicas.

El papel del sistema IGF en la carcinogénesis se ha convertido en tema de una intensa investigación en los últimos 20 años. Este interés siguió al descubrimiento del hecho de que, además de sus propiedades mitógenas y de antiapoptosis, el IGF-1R parece ser necesario tanto para el establecimiento como para el mantenimiento de un fenotipo transformado. De hecho, se ha establecido ampliamente que una sobreexpresión o una activación constitutiva del IGF-1R conduce, en una gran variedad de células, a un crecimiento de las células independiente del soporte en medios desprovistos de suero fetal bovino, así como a la formación de tumores en ratones desnudos. Esto, en sí mismo, no es una propiedad única ya que una gran variedad de productos de genes sobreexpresados puede transformar células, incluyendo a un buen número de receptores de los factores de crecimiento. Sin embargo, el descubrimiento crucial que ha demostrado claramente el papel principal que ha desempeñado el IGF-1R en la transformación ha sido la demostración de que las células IGF-1R<sup>-</sup>; en las que el gen que codifica IGF-1R ha sido inactivado, son totalmente resistentes a la transformación por los diferentes agentes que generalmente son capaces de transformar células, tales como la proteína E5 del virus del papiloma bovino, una sobreexpresión del EGFR o del PDGFR, el antígeno T del SV40, ras activado, o la combinación de estos dos últimos factores.

En este contexto el IGF-1R se ha considerado durante un largo tiempo una diana interesante en oncología. Se han iniciado un gran número de proyectos que se dirigen ("targeting") al IGF-1R (anticuerpos humanizados o humanos o moléculas pequeñas) para desarrollar antagonistas de IGF-1R para el tratamiento de cánceres y se han realizado más de 70 ensayos clínicos en varias indicaciones. Sin embargo, hasta el momento, ninguno de estos proyectos ha resultado exitoso 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 las utilidades de los mismos, en particular en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. El documento US 2013/084243 divulga un anticuerpo de mamífero, denominado 12B1 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, que se unen específicamente a IGF-1R y se pueden utilizar para diagnosticar y tratar el cáncer dependiente de IGF-1R.

### 55 **Descripción**

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

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

Se ha informado de intentos previos de desarrollar un anticuerpo valioso que pueda utilizarse como una herramienta de diagnóstico o pronóstico relevante pero ninguno de éstos resultan satisfactorios.

65 Como resultará evidente a partir de los ejemplos siguientes, los inventores se han sorprendido al demostrar que

los anticuerpos comerciales utilizados habitualmente en este momento para puntuar los tumores que expresan IGF-1R parecen no ser relevantes ya que proporcionan falsos positivos y/o falsos negativos. Esta cuestión ha conducido, en parte, al fracaso de los ensayos clínicos con anticuerpos IGF-1R debido a la selección de pacientes más que a la actividad real de los anticuerpos IGF-1R.

5 Además, los primeros estudios realizados que utilizan anticuerpos comerciales mostraron una discrepancia entre la puntuación de IGF-1R y la actividad antitumoral de la terapia de ADC dirigida.

10 Esta cuestión se soluciona en la presente memoria proporcionando un nuevo anticuerpo que, contrariamente a los existentes, es apto para infiltrarse, lo que correlaciona con la farmacología de la terapia dirigida de IGF-1R.

15 Un primer aspecto se refiere a un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a IGF-1R, preferentemente IGF-1R humano, con una afinidad elevada y que puede resultar así útil en métodos para diagnosticar trastornos oncogénos hiperproliferativos patológicos mediados 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 secuencias SEC ID n°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

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

- i) una cadena pesada con CDR-H1 de secuencia SEC ID n°: 1, CDR-H2 de secuencia SEC ID n°: 2 y CDR-H3 de secuencia SEC ID n°: 3; y
- 25 ii) una cadena ligera con CDR-L1 de secuencia SEC ID n°: 4, CDR-L2 de secuencia SEC ID n°: 5 y CDR-L3 de secuencia SEC ID n°: 6.

30 Los términos "anticuerpo", "anticuerpos", "ab" o "inmunoglobulina" son utilizados indistintamente en su sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos aislados, diseñados por ingeniería, sintetizados químicamente o recombinantes (por ejemplo, anticuerpos monoclonales completos o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes o multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y también los fragmentos de anticuerpo, siempre que estos muestren la actividad biológica deseada. En un aspecto adicional la invención se refiere a un anticuerpo recombinante.

35 Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, la expresión "anticuerpo IGF-1R" deberá ser interpretada de manera similar a la de "anticuerpo anti-IGF-1R", y significa un anticuerpo capaz de unirse al IGF-1R.

40 Mediante "fragmento de unión al antígeno" o "fragmento de unión a IGF-1R" de un anticuerpo, se pretende indicar cualquier péptido, polipéptido, o proteína, que mantenga la capacidad de unirse al IGF-1R diana (también denominado generalmente como antígeno) del anticuerpo. En un aspecto, dichos "fragmentos de unión al antígeno" son seleccionados de entre el grupo que consiste en fragmentos o diacuerpos Fv, scFv (sc para las cadenas sencillas), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc, o cualquier fragmento del cual el tiempo de vida media haya sido aumentado por medio de la modificación química, tal como por la adición de un poli(alquilen)glicol tal como el poli(etilenglicol) ("PEGilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG, o Fab'-PEG) ("PEG" para poli(etilenglicol)), o por la incorporación en un liposoma, presentando dichos fragmentos por lo menos una de las CDR características del presente anticuerpo. Preferentemente, dichos "fragmentos de unión al antígeno" estarán constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo a partir del cual desciende y una afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, de una manera más preferida a por lo menos 1/10, de la afinidad del anticuerpo a partir del cual desciende, con respecto a la diana.

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

- 55 i) la CDR-H1 de secuencia SEC ID n°: 1, CDR-H2 de secuencia SEC ID n°: 2 y CDR-H3 de secuencia SEC ID n°: 3; y
- ii) la CDR-L1 de secuencia SEC ID n°: 4, CDR-L2 de secuencia SEC ID n°: 5 y CDR-L3 de secuencia SEC ID n°: 6.

60 Por "unión", "se une" o similares, se entiende que el anticuerpo, o cualquier fragmento de unión al antígeno del mismo, forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica puede estar caracterizada mediante una constante de disociación del equilibrio de por lo menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  M o menos. Los métodos para la determinación de si dos moléculas se unen son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, la diálisis de equilibrio, la resonancia del plasmón superficial, y similares. Con el propósito de evitar dudas, esto no significa que dicho anticuerpo no pueda unirse o interferir, a

un nivel bajo, con otro antígeno. Sin embargo, como una forma de realización, dicho anticuerpo se une únicamente a dicho antígeno.

5 Mediante regiones CDR o CDR(s), se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas como son definidas por el IMGT.

10 La numeración única del IMGT ha sido definida con el fin de comparar los dominios variables independientemente del receptor, del tipo de la cadena, o de la especie del antígeno [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 única del IMGT, los aminoácidos conservados siempre presentan la misma posición, por ejemplo, la cisteína 23 (1a-CYS), el triptófano 41 (TRP-conservado), el aminoácido hidrófobo 89, la cisteína 104 (2a-CYS), la fenilalanina o el triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única del IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: posiciones 39 a 55, FR3-IMGT: posiciones 66 a 104, y FR4-IMGT: posiciones 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. Ya que los espacios representan posiciones desocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre corchetes y separadas por medio de puntos, por ejemplo [8.8.13]) se convierten en información crucial. La numeración única del IMGT es utilizada en representaciones gráficas 2D, denominadas IMGT Collier 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 3D 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)].

25 Debe entenderse que, sin una especificación contradictoria en la presente memoria descriptiva, las regiones determinantes de complementariedad o CDR, se refieren a las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas como se define de acuerdo con el sistema de numeración del IMGT.

30 Sin embargo, las CDR también pueden ser definidas según el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et. al.*, *Sequences of proteins of immunological interest*, 5th 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 "CDRs" son utilizados con el fin de indicar, dependiendo del caso, una o más, o incluso todas, las regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la afinidad de unión del anticuerpo al antígeno o epítipo que reconoce. Con el propósito de simplificar la lectura de la presente solicitud, las CDR de acuerdo con Kabat no están definidas. Sin embargo, resulta evidente para un experto en la materia, utilizando la definición de las CDR de acuerdo al IMGT, definir las CDR según Kabat.

35 En una forma de realización particular, el presente anticuerpo IGF-1R está caracterizado por que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEC ID n°: 7, o cualquier secuencia con por lo menos 90% de homología con la secuencia SEC ID n°: 7.

40 En una forma de realización particular, el presente anticuerpo IGF-1R está caracterizado por que comprende un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEC ID n°: 8, o cualquier secuencia con por lo menos 90% de homología con la secuencia SEC ID n°: 8.

45 Según todavía otra forma de realización, el anticuerpo al que se hace referencia como 816C12, está caracterizado por que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID n°: 7 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de homología tras la alineación óptima con la secuencia SEC ID n°: 7; y/o por que comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido SEC ID n°: 8 o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de homología tras la alineación óptima con la secuencia SEC ID n°: 8.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de homología" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos o de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenido después de un óptimo alineamiento, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias estando distribuidas aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos tradicionalmente se realiza comparando las secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, pudiéndose llevar a cabo dicha comparación ya sea por segmentos o mediante la utilización de una "ventana de alineamiento". El alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación se puede llevar a cabo, además de por la comparación manual, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [*Ad. App. Math.* 2: 482], por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [*J. Mol. Biol.* 48: 443], por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444] o mediante software de computadora que utiliza estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA, en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o mediante el software de comparación BLAST NR o el BLAST P). Para la secuencia de aminoácidos que exhibe por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 85%, 90%, 95%, o 98% de homología con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos

incluyen aquellos que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, particularmente una delección, la adición o la sustitución de por lo menos un aminoácido, un truncamiento o una extensión. En el caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en las cuales los aminoácidos sustituidos son reemplazados por aminoácidos "equivalentes". En la presente memoria, la expresión "aminoácidos equivalentes" pretende indicar cualquier aminoácido que pueda ser sustituido 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 se pueden determinar 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 unión a antígeno que probablemente será generada.

Como un ejemplo no limitativo, la tabla 1 a continuación resume las sustituciones posibles que podrían llevarse a cabo sin dar como resultado una modificación significativa de la actividad biológica de la proteína de unión a antígeno modificada correspondiente; las sustituciones inversas son naturalmente posibles bajo 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 al antígeno del mismo, no se une al receptor de insulina (IR).

En otro aspecto el presente anticuerpo consiste en un anticuerpo monoclonal.

El término "anticuerpo monoclonal" o "Mab" como es utilizado en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, que los anticuerpos individuales de dicha población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de manera natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único epítipo. Dicho anticuerpo monoclonal puede ser producido mediante un solo clon de células B o hibridoma. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser recombinantes, es decir, producidos por medio de la ingeniería de proteínas. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser aislados a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen típicamente diversos anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes o epítopos, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único epítipo del antígeno. El anticuerpo es aislado u obtenido mediante purificación a partir de fuentes naturales y obtenido por recombinación genética o síntesis química.

En otro aspecto 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 dentro de células vivas. Se obtiene un anticuerpo recombinante usando métodos de laboratorio de recombinación genética, bien conocidos por un experto en la materia, creando secuencias de ADN que no se encontrarían en organismos biológicos.

En otro aspecto el presente anticuerpo consiste en un anticuerpo sintetizado químicamente.

El "anticuerpo IGF-1R" incluye (sin una especificación contraria) la forma murina, pero también la quimérica y humanizada de dicho anticuerpo IGF-1R.

5 Para una mayor claridad, la tabla 2 siguiente ilustra las secuencias del anticuerpo 816C12, que se definen de acuerdo con el IMGT.

Tabla 2

Anticuerpo	Numeración CDR	Cadena Pesada	Cadena Ligera	SEC ID n°.
816C12 I-4894	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

10 En un aspecto, el anticuerpo monoclonal en la presente memoria incluye anticuerpo murino, quimérico y humanizado. El anticuerpo puede derivar de un hibridoma de origen murino presentado en la colección francesa de cultivos de microorganismos (CNCM, Pasteur Institute, París, Francia), siendo dicho hibridoma obtenido por medio de la fusión de esplenocitos/linfocitos inmunizados Balb/C de ratones y células de la línea celular de mieloma Sp 2/O-Ag 14.

15 Según otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino apto para secretar un anticuerpo monoclonal como es divulgado anteriormente, particularmente el hibridoma de origen murino depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, el 17 de septiembre de 2014, bajo el número I-4894.

20 El anticuerpo monoclonal, al que se hace referencia en la presente memoria como 816C12, o cualquier fragmento de unión a antígeno del mismo, que es secretado por dicho hibridoma I-4894 forma parte obviamente de la presente invención.

25 La invención se refiere a un anticuerpo IGF-1R, o 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, 2014, con el número I-4894.

30 La invención describe asimismo el hibridoma murino presentado en la CNCM, Institut Pasteur, París, el 17 de septiembre, con el número I-4894.

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

- 35 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 n°: 9 o 10, o una secuencia con por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de homología tras una alineación óptima con las secuencias SEC ID n°: 9 o 10; y
- 40 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 816C12

Tabla 3

Anticuerpo	Cadena Pesada	Cadena Ligera	SEC ID n°.
816C12 I-4894	dominio variable		9
		dominio variable	10

45 Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácidos nucleicos", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos", utilizados de manera indistinta en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificados o no, que define un fragmento o a una región de un ácido nucleico, conteniendo nucleótidos no naturales o no, y siendo o bien un ADN de doble hélice, o un ADN de una sola hélice, o productos de transcripción de dichos ADN.

Debería asimismo incluirse en la presente memoria 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 directa o indirectamente, por ejemplo mediante una copia, habiendo sido su ambiente modificado por lo menos parcialmente. Deberían asimismo mencionarse en la presente memoria ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, mediante, por ejemplo, células hospedadoras, u obtenidos por síntesis química.

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

Se proporcionan particularmente los vectores de expresión y/o clonación que contienen una secuencia de nucleótidos de este tipo.

Los presentes vectores contienen preferentemente los elementos que permiten la expresión y/o la secreción de secuencias de nucleótidos en una célula hospedadora dada. El vector debe así contener un promotor, señales de terminación e inicio de traducción, así como regiones de regulación de la transcripción adecuadas. Debe poderse mantener de una manera estable en la célula hospedadora y puede presentar opcionalmente unas señales específicas que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diversos elementos son seleccionados y optimizados por un experto en la materia según la célula hospedadora utilizada. Para este fin, las secuencias de nucleótidos pueden ser insertadas en vectores de autorreplicación dentro de la célula hospedadora seleccionada o ser vectores integrantes del hospedador seleccionado.

Estos vectores se preparan mediante métodos utilizados típicamente por un experto en la materia y los clones resultantes pueden introducirse en un hospedador adecuado mediante métodos estándares tales como lipofección, electroporación, choque térmico o métodos químicos.

Los vectores son, por ejemplo, vectores de origen plásmido o vírico. Son utilizados para transformar las células hospedadoras para clonar o expresar las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria.

La invención comprende asimismo 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 tales como células bacterianas, por ejemplo, pero asimismo células de levadura o células de animal, particularmente células de mamífero. Pueden utilizarse asimismo células de insecto o planta.

La divulgación se refiere asimismo a animales, diferentes al hombre, que presentan una célula transformada descrita 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 etapas siguientes:

- 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, así producido a partir del medio de cultivo o a partir de dichas células cultivadas.

Dichas células transformadas son de utilización en los métodos para la preparación de los polipéptidos recombinantes descritos en la presente memoria. Están asimismo comprendidos en la presente invención los métodos para la preparación de estos polipéptidos en forma recombinante, caracterizados por que dichos métodos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector descrito en la presente memoria. Preferentemente, una célula transformada mediante dicho vector es cultivada bajo unas 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 nucleótido que facilitan la secreción en dicho sistema procariota o eucariota. Puede utilizarse por lo tanto ventajosamente un vector portador de dicha secuencia para la producción de proteínas recombinantes que deben secretarse. De hecho, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés será facilitada por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular más que en el interior de las células hospedadoras.

También es divulgado el uso del presente anticuerpo como biomarcador. Los métodos pueden ser utilizados con el fin de detectar o de diagnosticar varios trastornos oncogénos hiperproliferativos asociados con la expresión del IGF-1R ejemplificados por, pero no limitados a, el cáncer de próstata, los osteosarcomas, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer endometrial, el glioblastoma, el cáncer de colon, el cáncer gástrico, el cáncer renal, el cáncer de páncreas, el cáncer de la cabeza y del cuello, o cualquier otro cáncer asociado con la expresión del IGF-

1R. Como sería reconocido por un experto en la materia, el nivel de expresión del anticuerpo asociado con un trastorno particular variará dependiendo de la naturaleza y/o de la gravedad de la afección preexistente.

5 La administración de los presentes anticuerpos en cualesquiera de las maneras convencionales conocidas por el experto en la materia (por ejemplo, tópica, parenteral, intramuscular, etc.), proporcionará un método extremadamente útil de detectar células displásicas en una muestra así como permitir a un clínico monitorizar el régimen terapéutico de un paciente sometido a un tratamiento para un trastorno hiperproliferativo asociado con o mediado por la expresión de IGF-1R.

10 El presente anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, encontrará utilización en varias finalidades de investigación o médicas, que incluyen la detección, el diagnóstico, el pronóstico y la estadificación de varias patologías asociadas a la expresión de IGF-1R.

15 Un aspecto de la divulgación se refiere al anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente para la utilización como un agente para la detección de las células tumorales que expresan IGF-1R.

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

25 “Diagnosticar” una enfermedad como se utiliza en la presente memoria se refiere al proceso de identificar o detectar la presencia de un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico asociado a o mediado por la expresión de IGF-1R, monitorizar la progresión de la enfermedad, e identificar o detectar las células o muestras que son indicativas de un trastorno asociado a la expresión de IGF-1R.

30 “Pronóstico” como se utiliza en la presente memoria significa la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la predicción del desarrollo o del resultado probable de la enfermedad. Por ejemplo, si una muestra de un sujeto es negativa para la 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 ser puntuadas para los niveles de expresión de IGF-1R en una escala apropiada como se detallará más adelante.

35 El anticuerpo IGF-1R puede estar presente en forma de un inmunocombinado o de un anticuerpo etiquetado para obtener una señal detectable/cuantificable. Cuando se utiliza con etiquetas adecuadas u otros biomoléculas detectables o productos químicos adecuados, el anticuerpo IGF-1R resulta particularmente útil para aplicaciones de diagnóstico y pronóstico *in vitro* e *in vivo*.

40 Las etiquetas para la utilización en inmunoensayos son conocidas generalmente por los expertos en la materia e incluyen enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromógenas, que incluyen partículas coloreadas tales como perlas de látex o de oro coloidales. Los inmunoensayos adecuados incluyen enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA). Varios tipos de etiquetas y métodos de conjugar las etiquetas a los anticuerpos IGF-1R son bien conocidos por el experto en la materia, tales como los expuestos a continuación.

45 Como se utiliza en la presente memoria, el término “un trastorno oncógeno asociado con la expresión de IGF-1R” está destinado a incluir las enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de niveles elevados de IGF-1R (aberrante) en un sujeto que padece el trastorno ha demostrado ser o se sospecha que es responsable de la patofisiología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Alternativamente, dichos trastornos pueden evidenciarse, por ejemplo, por un aumento en los niveles de IGF-1R sobre 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 utilizando el anticuerpo IGF-1R.

55 En ciertos aspectos “expresión aumentada” en cuanto a se relaciona a IGF-1R se refiere a los niveles de expresión de proteínas o genes que demuestran un aumento estadísticamente significativo en la expresión (como se mide mediante la expresión de ARN o la expresión de proteínas) en relación a un control.

60 Una forma de realización es un anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe anteriormente, para la utilización en determinar 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.

65 Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, la expresión “inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R” significa cualquier compuesto apto para disminuir o inhibir la actividad tirosina cinasa de IGF-1R, mediante la unión al(a los) ligando(s) de IGF-1R o al propio IGFR. Los ejemplos de dichos inhibidores son proteína, péptidos, anticuerpos o conjugados anticuerpo-fármaco o cualquier compuesto químico que actúe como antagonistas de IGF-1R, oligonucleótidos antisentido o ARNip que inhiben la expresión del gen de IGF-1R o de un gen que codifica uno del(de los) ligando(s) de IGFR, o cualquier otro fármaco o compuesto conocido por el experto en la materia.

Más particularmente, en el contexto de la presente memoria descriptiva, el inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R está destinado a comprender cualquier compuesto o molécula apto/a para unirse a IGF-1R e inhibir la unión de su(s) ligando(s).

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

En otro aspecto preferido el inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R consiste en un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que la porción de anticuerpo se dirige a IGF-1R y la porción de fármaco puede seleccionarse de entre cualesquier fármacos tales como citotóxico, citostático, toxinas, etc. En una forma de realización ejemplificada, la porción de fármaco puede consistir en 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 células tumorales que expresan IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (a) poner en contacto una muestra biológica de un 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 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, 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 varios ensayos disponibles para el experto en la materia. Aunque se incluyen cualesquier medios adecuados para realizar los ensayos, pueden mencionarse en particular la clasificación de células activadas por fluorescencia (FAC), ELISA, transferencia western e inmunohistoquímica (IHC). Los métodos preferidos incluyen IHC y FACS.

Se proporciona un método para detectar *in vivo* 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.

Otro aspecto es 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, 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 unión a antígeno del mismo, a IGF-1R en dicha muestra biológica.

Como resultará evidente para el experto en la materia, el nivel del anticuerpo IGF-1R que se une a IGF-1R puede cuantificarse mediante cualesquier medios conocidos por el experto en la materia. Los métodos preferidos implican la utilización de procesos inmunoenzimáticos, tales como ensayos ELISA, inmunofluorescencia, IHC, radioinmunoensayo (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 es cuantificado mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o inmunohistoquímica (IHC).

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

así dependiente 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.

5 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.

10 Preferentemente, la muestra biológica es un líquido biológico, tal como suero, células de sangre entera, una muestra de tejido o una biopsia de origen humano. La muestra puede por ejemplo incluir, tejido biopsiado, que puede someterse a ensayo de manera conveniente respecto a la presencia de un trastorno oncogénico patológico asociado con la expresión de IGF-1R.

15 Una vez se ha realizado la determinación del nivel de expresión de IGF-1R en las muestras biológicas sometidas a prueba, los resultados pueden compararse con los de las muestras de control, que son obtenidas de manera similar a las muestras biológicas sometidas a prueba pero de individuos que no presentan un trastorno oncogénico asociado con la expresión de IGF-1R. Si el nivel de IGF-1R es elevado de manera significativa en la muestra biológica sometida a prueba, puede concluirse que existe una probabilidad aumentada de que el sujeto del que deriva presente o desarrolle dicho trastorno.

20 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 el método para determinar *in vivo* o *ex vivo* el nivel de expresión de IGF-1R en células tumorales o en un tumor en un sujeto como se describe 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 de tejido que no expresa IGF-1R.

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

30 La determinación del estadio tiene un valor de pronóstico potencial y proporciona criterios para el diseño de una terapia óptima. Simpson *et. al.*, J. Clin. Oncology 18:2059 (2000). Por ejemplo, la selección del tratamiento para tumores sólidos está basada en la estadificación tumoral, la cual generalmente es realizada utilizando la prueba de tumor/nodo/metástasis (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC). Es comúnmente reconocido que, mientras que este sistema de prueba y de estadificación proporciona cierta información valiosa que se refiere al estadio en el cual un cáncer sólido ha sido diagnosticado en el paciente, es impreciso e insuficiente. En particular, no es capaz de identificar las etapas más tempranas de la progresión del tumor.

35 Otro aspecto consiste en un método para la determinación *in vitro* o *ex vivo* de la puntuación del IGF-1R de células tumorales en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 40
- (a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con el anticuerpo IGF-1R, o con un fragmento de unión al antígeno del mismo, como se describe anteriormente;
  - 45 (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 al antígeno del mismo, al IGF-1R en dicha muestra biológica; y
  - 50 (c) determinar la puntuación de las células tumorales o tumor mediante la comparación del nivel cuantificado obtenido en la etapa (b) con una escala apropiada basada en dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.

55 En un aspecto, el anticuerpo IGF-1R es capaz de unirse al IGF-1R cuando las muestras de tejido son fijadas con formalina, con formol sustituido, con Glyco-fixx, embebidas y/o congeladas con parafina.

60 Cualquier método convencional para el análisis de riesgos puede ser utilizado con el fin de estimar el valor pronóstico del IGF-1R. Los métodos de análisis representativos incluyen el análisis de regresión de Cox, que es un método semiparamétrico para el modelado de datos de supervivencia o en tiempo-al-evento en la presencia de casos censurados (Hosmer and Lemeshow, 1999; Cox, 1972). En contraste con otros análisis de supervivencia, por ejemplo, las tablas de vida o Kaplan-Meyer, Cox permite la inclusión de variables de predicción (covariables) en los modelos. Mediante el uso de un método de análisis por convención, por ejemplo, Cox, se puede ser capaz de probar una hipótesis con respecto a la correlación del estado de expresión del IGF-1R en un tumor primario y el tiempo hasta la aparición ya sea de una recaída de enfermedad (tiempo de supervivencia libre de enfermedad, o tiempo para una enfermedad metastásica), o el tiempo para la muerte de la enfermedad (tiempo total de supervivencia). El análisis de regresión de Cox también es conocido como el 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 es utilizado en modo multivariante, el efecto de varias covariables es probado en paralelo de tal manera que puedan ser identificadas las covariables individuales que presentan un valor de pronóstico independiente, es decir, los marcadores más útiles. Puede hacerse referencia asimismo al término "estado del IGF-1R" negativo o positivo como [IGF-1R (-)] o [IGF-1R (+)].

Una muestra puede recibir una "puntuación" durante el diagnóstico o la monitorización del cáncer. En su forma más simple, esta puntuación puede ser negativa o positiva categórica de conformidad a lo juzgado por el examen visual de las muestras por medio de una inmunohistoquímica. Una puntuación más cuantitativa implica juzgar los dos parámetros, la intensidad de la tinción y la proporción de células teñidas ("positivas") que son muestreadas.

"Estado de IGF-1R" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la clasificación del tumor a una clase IGF-1R positivo [IGF-1R (+)] o IGF-1R negativo [IGF-1R (-)] sobre la base de la determinación del nivel de expresión del IGF-1R como se mide mediante cualesquier métodos tales como inmunohistoquímica (IHC), clasificación de células activadas por fluorescencia FACS, u otros métodos conocidos por el experto en la materia.

En un aspecto, con el propósito de asegurar la estandarización, las muestras pueden recibir una puntuación para los niveles de expresión del IGF-1R en escalas diferentes, la mayoría de ellas sobre la base de la 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 otro aspecto, dicha puntuación, particularmente en la etapa (c) del presente método, comprende la utilización de una escala apropiada basada en la intensidad de la tinción y en el porcentaje de células positivas.

Como un primer ejemplo, por analogía con la puntuación rápida Allred para la evaluación de IHC del receptor de estrógeno y del receptor de progesterona, las muestras pueden recibir una puntuación para los niveles de expresión del IGF-1R en una escala global de 0 a 8 combinando las puntuaciones referentes para la intensidad de reactividad y para la proporción de células teñidas (Harvey JM, Clarck GM, Osborne CK, Alfred DC, J. Clin. Oncol. 1999; 17; 1474-1481). Más particularmente, el primer criterio de la intensidad de la reactividad está puntuado en una escala de 0 a 3, 0 correspondiendo a la "no reactividad" y 3 correspondiendo a una "fuerte reactividad". El segundo criterio de la proporción reactiva está puntuado dentro de una escala de 0 a 5, 0 correspondiendo a la "no reactividad" y 5 correspondiendo a "67 a 100% de proporción reactiva". La intensidad de la puntuación de la reactividad y la puntuación de la proporción reactiva son sumados con el fin de producir la puntuación total de 0 a 8. Una puntuación total de 0 a 2 es considerada como negativa, mientras que una puntuación total de 3 a 8 es considerada como positiva.

De acuerdo con esta escala, los términos "estado del IGF-1R" negativo o positivo de los tumores o de las células tumorales utilizados en la presente descripción hacen referencia a los niveles de expresión del IGF-1R que corresponden a las puntuaciones 0 a 2 o 3 a 8 en la escala Allred, respectivamente.

La tabla 4 ilustra en adelante las pautas para la interpretación de los resultados de IHC de acuerdo con el método Allred.

Tabla 4

Intensidad de la inmunoreactividad	Puntuación 1	Proporción Reactiva	Puntuación 2
No reactividad	0	No 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 a 2		Negativo	
3 a 8		Positivo	

El método está caracterizado por que dicha escala apropiada es una escala de 0 a 8 en la que la no reactividad recibe una puntuación de 0, y una fuerte reactividad en una proporción de 67 a 100% de la proporción reactiva recibe una puntuación de 8.

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

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

- 5 (a) determinar la puntuación de un tumor o de células tumorales de un sujeto de acuerdo con la escala Allred y
- (b)
- 10 -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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 En un aspecto particular, el estado del tumor o de las células tumorales es [IGF-1R (+)] con una puntuación Allred de 7.
- 30 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.
- 35 Otro método particular descrito en la presente memoria para determinar *in vitro* o *ex vivo* el estado del IGF-1R de las células tumorales o del tumor en un sujeto, está caracterizado por que comprende las etapas de:
- 40 (a) determinar la puntuación del IGF-1R del tumor o de las células tumorales de dicho sujeto según el método de la reivindicación 18; y
- (b) determinar que el estado IGF-1R de las células tumorales o del tumor es [IGF-1R (+)] con una puntuación de 3 a 8; o
- 45 (c) determinar que el estado IGF-1R de las células tumorales o del tumor es [IGF-1R (-)] con una puntuación de 0 a 2.

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

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

60 En términos generales, los términos "estado de IGF-1R" negativo o positivo de los tumores o de las células utilizados en la presente descripción, se refieren a los niveles de expresión del IGF-1R que corresponden en la escala simplificada, a las puntuaciones 0 a 1+ o 2+ a 3+ respectivamente. Sólo debería ser considerada la reactividad membranaria circunferencial completa del tumor invasivo que, con frecuencia, presenta una apariencia que asemeja a un "alambre de gallinero". De conformidad con las pautas actuales, es requerido que las muestras con una puntuación límite (puntuación de 2+ o 3+) para IGF-1R sean sometidas a una evaluación adicional. El análisis de IHC debe ser rechazado, y ya sea que éste sea repetido o probado con FISH o con algún otro método

65 en caso de que, como ejemplo no limitativo, los controles no sean como se esperaba, los artefactos involucren la

mayoría de la muestra y la muestra presente una fuerte positividad membranaria de los conductos mamarios normales (controles internos) sugiriendo una recuperación excesiva de antígenos.

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

5

Tabla 5

Estado de IGF-1R	Descripción de IHC
0	No existe reactividad o reactividad membranaria en menos de 10% de las células tumorales
1+	Reactividad membranaria débil/apenas perceptible en más de 10% de las células tumorales. Las células son inmunorreactivas solo en parte de la membrana.
2+	Reactividad membranaria completa, de escasa a moderada, se observa en más de 10% de las células tumorales.
3+	Reactividad completa fuerte se observa en más de 10% de las células tumorales.

10 El presente método está caracterizado por que dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3<sup>+</sup> en la que la no reactividad membranaria de las células tumorales recibe una puntuación de 0 y una reactividad completa fuerte en más del 10% de las células tumorales recibe una puntuación de 3<sup>+</sup>.

15 Con mayor detalle, como se describe anteriormente, dicha escala apropiada es una escala de 0 a 3 en la que la no reactividad membranaria de las células tumorales recibe una puntuación de 0; una reactividad membranaria débilmente perceptible en más del 10% de las células tumorales recibe una puntuación de 1+; una reactividad membranaria completa de escasa a moderada en más del 10% de las células tumorales recibe una puntuación de 2+; y una reactividad completa fuerte en más del 10% de las células tumorales recibe una puntuación de 3+.

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

25

En un aspecto particular, un tumor o las células tumorales es [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+.

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

En otro aspecto, se proporciona un método para la determinación *in vitro* o *ex vivo* del estado de IGF-1R de las células tumorales o un tumor en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

35 (a) determinar la puntuación de dicho IGF-1R de las células tumorales o dicho tumor de dicho sujeto como se describe anteriormente; y

(b)

40 -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 o 1<sup>+</sup>.

45 Generalmente, los resultados de una prueba o de un ensayo pueden ser presentados en cualquiera de una variedad de formatos. Los resultados pueden ser presentados cualitativamente. Por ejemplo, el informe de la prueba puede indicar únicamente si fue detectado, o no, un polipéptido en particular, quizás también con una indicación de los límites de detección. Los resultados pueden ser mostrados de manera semicuantitativa. Por ejemplo, pueden ser definidos varios intervalos, y estos intervalos pueden ser asignados a una puntuación (por ejemplo, de 0 a 3+, o de 0 a 8, dependiendo de la escala utilizada) que proporcione un cierto grado de información

50 cuantitativa. Dicha puntuación puede reflejar varios factores, por ejemplo, el número de células en las cuales es detectado el IGF-1R, la intensidad de la señal (que puede indicar el nivel de expresión del IGF-1R o de las células que portan el IGF-1R), etc. Los resultados pueden ser mostrados de manera cuantitativa, por ejemplo, como un porcentaje de células en las cuales es detectado el IGF-1R, o como una concentración de proteínas, etc.

55 Como apreciará un experto en la materia, el tipo de resultado proporcionado por una prueba variará dependiendo tanto de las limitaciones técnicas de la prueba como de la importancia biológica asociada a la detección del polipéptido. Por ejemplo, en el caso de determinados polipéptidos, un resultado puramente cualitativo (por ejemplo,

si el polipéptido es detectado, o no, a un determinado 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 está siendo probada vs el nivel normal de expresión).

5 En otro aspecto, se describe un método de diagnóstico de un trastorno oncógeno hiperproliferativo patológico o una susceptibilidad a una afección patológica asociada con la expresión de IGF-1R en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

10 (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 del IGF-1R descrito anteriormente, y

15 (b) diagnosticar una afección patológica o susceptibilidad a una afección patológica sobre la base de 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 indican generalmente un paciente con o que se sospecha presenta un trastorno mediado por IGF-1R.

20 Se proporciona en la presente memoria un método para predecir el riesgo de un individuo de desarrollar un cáncer, comprendiendo dicho procedimiento 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 nivel elevado de la expresión de IGF-1R es indicador de un riesgo elevado de desarrollar cáncer.

25 Se proporciona asimismo en la presente memoria un método para evaluar la agresividad del tumor.

“Agresividad del tumor” como se utiliza en la presente memoria se refiere a un tumor que crece de manera rápida y que tiende a extenderse rápidamente.

30 En un aspecto dicho método para evaluar la agresividad del tumor comprende la etapa de:

35 (a) determinar el nivel de IGF-1R expresado por 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,

40 (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) determinar la relación entre el nivel de expresión obtenido en la etapa (a) y la relación obtenida en la etapa (b)

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

En un aspecto preferido una relación del nivel obtenido en la etapa (a) con respecto al nivel obtenido en la etapa (b) superior a 1 indica agresividad. En otra forma de realización, una relación inferior o igual a 1 indica sin agresividad.

50 Otro aspecto se refiere a la monitorización de la expresión de IGF-1R en respuesta a la administración de una terapia que se dirige a la ruta de IGF-1R implicando el método para la detección de, y/o para cuantificar IGF-1R, y/o para determinar el nivel de, expresión descrito anteriormente. Dicha monitorización puede resultar muy útil cuando dicha terapia activa la regulación a la baja y/o la degradación de IGF-1R.

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

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

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

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

5 La solicitud proporciona así métodos para determinar el régimen terapéutico apropiado para un sujeto.

10 Un aumento o una disminución en el nivel del IGF-1R que puede determinarse mediante el método para la detección del y/o para determinar el nivel de expresión divulgado en la presente memoria es indicativo de la evolución de un cáncer asociado al IGF-1R. Por lo tanto, mediante la medición de un aumento en el número de células que expresan el IGF-1R o de cambios en la concentración del IGF-1R presente en varios tejidos o células, es posible el determinar si un régimen terapéutico dirigido a mejorar una afección maligna asociada con el IGF-1R es efectivo.

15 Se proporciona en la presente memoria un método para la determinación *in vitro* o *ex vivo* de la eficacia de un régimen terapéutico diseñado con el fin de aliviar un trastorno oncógeno asociado al IGF-1R en un sujeto que padece dicho trastorno, comprendiendo dicho método las etapas de:

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

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

30 (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 dicho régimen terapéutico es alta cuando la proporción de la etapa (c) es superior a 1; o determinar que la eficacia de dicho régimen terapéutico es baja cuando la proporción de la etapa (c) es inferior o igual a 1.

35 En un aspecto preferido dicho régimen terapéutico diseñado con el fin de aliviar un trastorno oncógeno asociado con el IGF-1R en un sujeto que padece dicho trastorno incluye la administración de una terapia dirigida a la ruta del IGF-1R a dicho sujeto.

40 Se proporciona asimismo en la presente memoria un método *in vivo* para la formación de imágenes de un trastorno oncógeno asociado con la expresión del IGF-1R que utiliza el método para la detección y/o la determinación del nivel de expresión descrito en la presente memoria. Dicho método es útil para la localización *in vivo* de las células tumorales, así como para la monitorización de su invasividad. Del mismo modo, el método es útil para monitorizar la progresión y/o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido previamente diagnosticados con un cáncer mediado por el IGF-1R.

45 Un aspecto de la divulgación es un método para detectar la ubicación de células tumorales que expresan IGF-1R es un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

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

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

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

En cuanto a la detección de la presencia de un tumor con expresión, pueden ser utilizadas muchas de las técnicas conocidas por un experto en la materia. Sin embargo, los medios preferidos son la IHC y la FACS.

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

65 Se contempla asimismo en la presente memoria la utilización de dicho reactivo en la formación de imágenes médica 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 de imágenes descrito en la presente memoria y

5 (b) detectar dicho reactivo.

En un aspecto preferido 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.

10 Una "porción activa" como se utiliza 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 radioelementos tales como tecnecio-99m (99m Tc), 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).

15 El agente de formación de imágenes es administrado en una cantidad eficaz para la utilización diagnóstica en un mamífero tal como un humano y se detecta a continuación la ubicación y la acumulación del agente de formación de imágenes. La ubicación y la acumulación del agente de formación de imágenes puede detectarse mediante formación de imágenes de radionúclidos, radioescintigrafía, formación de imágenes de resonancia magnética nuclear, tomografía computarizada, tomografía de emisión de positrones, tomografía axial computarizada, método de formación de imágenes de resonancia magnética o rayos X, detección de fluorescencia, y detección quimioluminiscente.

20 Con respecto al desarrollo de la terapia antitumoral dirigida, el diagnóstico con técnicas inmunohistológicas proporciona información *in situ* sobre el nivel de expresión de 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 necesario para dicho tratamiento.

25 Un aspecto interesante particular se refiere a un método para seleccionar un paciente de 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 IGF-1R, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 30 (a) determinar el nivel de expresión de IGF-1R según el método descrito anteriormente;
- (b) comparar el nivel de expresión de la etapa previa (a) con un nivel de expresión de referencia; y
- 35 (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 relación del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia es superior a 1; o
- 40 (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 relación del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia es inferior o igual a 1.

45 El nivel de expresión de IGF-1R se compara o se mide ventajosamente en relación con los niveles en una muestra o célula de control a los que se hace referencia asimismo como "nivel de referencia" o "nivel de expresión de referencia". "Nivel de referencia", "nivel de expresión de referencia", "nivel de control" y "control" son utilizados de manera intercambiable en la memoria descriptiva. Un "nivel de control" significa un nivel inicial separado medido en una célula de control comparable, que está generalmente libre de cáncer o enfermedad. Dicha célula de control puede ser del mismo individuo, dado que, incluso en un paciente con cáncer, el tejido que es el sitio del tumor comprende todavía tejido sano sin tumor. Puede provenir asimismo de otro individuo que es normal o no presenta la misma enfermedad de la que se obtiene la muestra de prueba para enferma. Como se utiliza en la presente memoria, el término "nivel de referencia" se refiere a un "nivel de control" de la expresión de IGF-1R utilizado para evaluar un nivel de prueba de la expresión de IGF-1R en una célula cancerosa que contiene la muestra de un paciente. Por ejemplo, cuando el nivel de IGF-1R en la muestra biológica de un paciente es superior al nivel de referencia de IGF-1R, las células se considerará que presentan un nivel de expresión elevado, o sobreexpresión, de IGF-1R. El nivel de referencia puede determinarse mediante una pluralidad de métodos. Los niveles de expresión pueden así definir el IGF-1R que portan las células o alternativamente el nivel de expresión de IGF-1R independiente del número de células que expresan IGF-1R. Por lo tanto el nivel de referencia para cada paciente puede ser prescrito mediante una relación de referencia de IGF-1R, en el que la relación de referencia puede ser determinada mediante cualquiera de los métodos para determinar los niveles de referencia descritos en la presente memoria.

50 Por ejemplo, el control puede ser un valor predeterminado, que puede adoptar una variedad de formas. Puede ser un valor de corte único, tal como una mediana o una media. El "nivel de referencia" puede ser un número único, aplicable por igual a cada paciente de manera individual, o el nivel de referencia puede variar, de acuerdo con subpoblaciones específicas de pacientes. Así, por ejemplo, los hombres más mayores podrían presentar un nivel de referencia diferente al de los hombres más jóvenes para el mismo cáncer, y las mujeres podrían presentar 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 someter a prueba. Asimismo, el “nivel de referencia” podría ser una determinada relación de IGF-1 en las células neoplásicas de un paciente con relación a los niveles de IGF-1R en células no tumorales dentro del mismo paciente. El “nivel de referencia” puede asimismo ser un nivel de IGF-1R de células cultivadas *in vitro*, que pueden ser manipuladas para simular células tumorales, o pueden ser manipuladas de cualquier otra manera que proporcione unos niveles de expresión que determinen de manera precisa el nivel de referencia. Por otro lado, el “nivel de referencia” puede establecerse sobre la base de grupos comparativos, tales como en grupos que no presenten unos niveles de IGF-1R elevados y grupos que presenten unos niveles de IGF-1R elevados. Otro ejemplo de grupos comparativos podrían ser grupos que presenten una enfermedad, afección o síntomas particulares y grupos sin la enfermedad. El valor predeterminado puede estar dispuesto, por ejemplo, donde una población sometida a prueba es dividida de manera igual (o desigual) en grupos, tal como un grupo de un riesgo bajo, un grupo de un riesgo medio y un grupo de un riesgo elevado.

El nivel de referencia puede asimismo determinarse por comparación del nivel de IGF-1R en poblaciones de pacientes que presentan el mismo cáncer. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante un análisis de histograma, en el que una cohorte completa de pacientes se presenta gráficamente, 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 a un nivel dado. Dos o más grupos separados de pacientes pueden determinarse mediante la identificación de subconjuntos de poblaciones de la cohorte que presentan el mismo o similares niveles de IGF-1R. La determinación del nivel de referencia puede realizarse sobre la base de un nivel que distingue mejor estos grupos separados. Un nivel de referencia puede asimismo representar los niveles de dos o más marcadores, uno de los cuales es IGF-1R. Pueden representarse dos o más marcadores, por ejemplo, una relación de los valores para los niveles de cada marcador.

Igualmente, una población aparentemente sana presentará un intervalo “normal” diferente que el que presentará una población que es conocido que presenta una afección asociada con la expresión de IGF-1R. Por lo tanto, el valor predeterminado seleccionado puede considerar la categoría en la que se encuentra un individuo. Los intervalos y categorías apropiados pueden seleccionarse sin más que una experimentación rutinaria por los expertos en la materia. Mediante “elevado”, “aumentado” se hace referencia a alto con relación a un control seleccionado. Típicamente el control se basará en individuos aparentemente sanos en una categoría de edad apropiada.

Debe apreciarse asimismo que los controles pueden ser, además de valores predeterminados, muestras de materiales sometidos a prueba en paralelo con los materiales experimentales. Los ejemplos incluyen tejido o células obtenidos en el mismo momento del mismo sujeto, por ejemplo, partes de una biopsia única, o partes de una muestra celular única del sujeto.

En otra forma de realización, se proporciona en la presente memoria una composición farmacéutica para la 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 etiquetado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se describe asimismo un 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, como se describe anteriormente, y preferentemente el anticuerpo 816C12.

Los materiales empaquetados que comprenden una combinación de reactivos en unas cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo diagnóstico, por ejemplo kits, están asimismo comprendidos 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 está etiquetado 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, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, amortiguadores (por ejemplo amortiguador de bloque o amortiguador de lisis) y similares. Dicho kit puede comprender un receptáculo que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos o similares, conteniendo dichos recipientes elementos separados. Por ejemplo, un recipiente puede contener un primer anticuerpo ligado a un vehículo parcialmente soluble o insoluble. Un segundo recipiente puede contener un segundo anticuerpo etiquetado de manera detectable, soluble, en forma liofilizada o en disolución. El receptáculo puede asimismo contener un tercer recipiente que contiene un tercer anticuerpo etiquetado de manera detectable en forma liofilizada o en disolución. Puede utilizarse un kit de esta naturaleza en el ensayo en sándwich. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para la utilización de diagnóstico o *in vitro* deseada.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden estar previstos como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que presente la concentración apropiada.

- 5 Todavía en otro aspecto, los anticuerpos IGF-1R o fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se detalla en la presente memoria se proporcionan etiquetados con una porción detectable, de manera que pueden ser empaquetados y utilizados, por ejemplo, en kits, para diagnosticar o identificar células que presentan el antígeno mencionado anteriormente. Los ejemplos no limitativos de dichas etiquetas incluyen fluoróforos tales como isotiocianato de fluoresceína; cromóforos, radionúclidos, biotina o enzimas. Dichos anticuerpos IGF-1R etiquetados pueden ser utilizados para la localización histológica del antígeno, ELISA, clasificación de células, así como otras técnicas inmunológicas para detectar o cuantificar IGF-1R, y células portadoras de este antígeno, por ejemplo.
- 10 Se proporciona en la presente memoria un kit, en el que dicho kit está caracterizado por que comprende un anticuerpo IGF-1R o fragmentos de unión a antígeno del mismo, como se describe en la presente memoria.
- 15 Se proporciona asimismo un kit, en el que dicho kit está caracterizado por que comprende un anticuerpo IGF-1R quimérico o humanizado o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que pueden obtenerse a partir de 6 CDR que presentan las secuencias SEC ID nº 1 a 6 del anticuerpo IGF-1R o fragmentos de unión a antígeno del mismo.
- 20 Se proporcionan asimismo unos kits que resultan útiles como un control positivo para la purificación o la inmunoprecipitación de IGF-1R de células. Para el aislamiento y la purificación de IGF-1R, el kit puede contener el anticuerpo IGF-1R o fragmentos de unión a antígeno del mismo como se detalla en la presente memoria acoplados a perlas (por ejemplo, perlas de sefaroza). Pueden proporcionarse kits que contengan 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 un prospecto sobre o asociado con el recipiente. Pueden estar incluidos los recipientes adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes y amortiguadores, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para la utilización de diagnóstico o *in vitro* deseada.
- 25 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 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 mediante los métodos de IHC y/o FACS.
- 30 En un aspecto 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 describe anteriormente, estando dicho anticuerpo etiquetado.
- 35 En un aspecto preferido el kit comprende además un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R e IGF-1R.
- 40 En otro aspecto preferido el kit útil para determinar el nivel de expresión de IGF-1R *in vitro* o *ex vivo* en un tumor que expresa IGF-1R, comprende además un reactivo útil para cuantificar el nivel de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R etiquetado y el IGF-1R.
- 45 Todavía en otro aspecto el kit comprende además: i) un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R etiquetado e IGF-1R, e ii) muestras de control positivas y negativas útiles para puntuar el nivel de expresión de IGF-1R.
- 50 Dicho kit puede comprender además un anticuerpo policlonal específico a los anticuerpos murinos o a anticuerpos humanos/humanizados, preferentemente dicho anticuerpo policlonal específico a anticuerpos murinos, humanizados o humanos está etiquetado.
- 55 De acuerdo con un aspecto particular el kit para seleccionar *in vitro* un paciente de cáncer que se predice que se beneficia o no se beneficia de la administración terapéutica de un inhibidor que se dirige a la ruta de IGF-1R puede comprender: i) un reactivo útil para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R e IGF-1R; ii) un nivel de control que ha correlacionado con la sensibilidad a un inhibidor de IGF-1R y/o iii) un nivel de control que ha correlacionado con la resistencia a un inhibidor de IGF-1R.
- 60 Se proporciona asimismo un kit, en el que dicho kit es para determinar si un paciente con un trastorno oncogénico 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, como se describe anteriormente.
- 65 En otra forma de realización, dicho kit de acuerdo está caracterizado por que comprende además
- i) un reactivo para detectar el grado de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R e IGF-1R sobre la superficie de las células tumorales; y/o
  - ii) un reactivo para cuantificar el nivel de unión entre dicho anticuerpo IGF-1R e IGF-1R sobre la superficie de las células tumorales.

**Leyendas de las figuras**

5 Figura 1: la representación gráfica de los valores de OD obtenidos con el anticuerpo 816C12 en ELISA rhIGF1R. El ajuste de datos y la determinación de EC<sub>50</sub> se determinan utilizando la aplicación Prism.

10 Figuras 2A-2C: patrones de inmunohistoquímica (IHC) de reconocimiento de tumor embebido en parafina MCF-7 con 816C12 (figura 2A), con anticuerpo anti-IGF-1R G11 (Roche Ventana) (figura 2B) o anticuerpo anti-IGF-1R AF-305 (R&D system) (figura 2C).

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

Figuras 4A-4C: patrones de inmunohistoquímica (IHC) de reconocimiento de tumor embebido en parafina SBC-5 con 816C12, 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 vitro* de un ADC anti-IGF-1R en el modelo de xenoinjerto SBC-5.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: generación y selección de 816C12**

Se produjeron y seleccionaron como se describe a continuación los Mab generados contra IGF-1R.

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

30 Tres días después unas células de bazo se fusionaron con células de mieloma SP20Ag14 con PEG al 50%. Tras 14 días de selección metabólica de HAT, se sometieron a prueba los sobrenadantes de hibridoma mediante FACS utilizando células de cáncer de mama MCF7. Se mantienen únicamente los anticuerpos de unión a MCF7.

35 Se clonan a continuación los anticuerpos de interés mediante dilución límite. Ocho días después de la clonación, se seleccionan una vez más los sobrenadantes mediante FACS utilizando células de MCF7. Se mantienen tres clones positivos. Se determina el isotipado de los anticuerpos segregados utilizando el kit HRP-sistema de clonotipado SBA de Southern Biotechnologies (Cat: 5300-05). Finalmente, se expande un clon y se congela.

40 Se realizan otras caracterizaciones del anticuerpo 816C12 utilizando sobrenadante de hibridoma tal como ELISA rhIGF-1R o rmlGF-1R o rhIR. En todos los ELISA directos, se inmovilizan las proteínas de interés (1 µg/ml) hasta el fondo de cada pocillo. Tras la saturación, los sobrenadantes de hibridoma se añaden a los pocillos. Tras un periodo de incubación de 1 hora y una etapa de lavado, se utiliza una solución de anticuerpo policlonal etiquetado HRP-IgG antirratón de cabra para la detección, antes de la adición del sustrato de TMB. La reacción se interrumpe con una solución de 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> antes de la lectura de OD con un espectrofotómetro a un longitud de onda de 450 nm. Los datos se presentan en la tabla 6.

45

Tabla 6

Valores de OD obtenidos a 5 µg/ml mediante ELISA			
	Recubrimiento rhIGF-1R	Recubrimiento rmlGF-1R	Recubrimiento rhIR
816C12	2.622	0.065	0.055
CTRL positivo	2.338	1.293	1.077
CTRL negativo	0.055	0.065	0.048

50 La curva de respuesta de dosis para el anticuerpo 816C12 en el recubrimiento rhIGF-1R se presenta en la figura 1. Los valores de EC<sub>50</sub> se determinan utilizando la aplicación Prism.

Los datos mostraron que el anticuerpo 816C12 reconoce únicamente rh IGF-1R con EC<sub>50</sub> de 0.41 nm. No se une a la forma murina del IGF-1R ni al IR humano.

**55 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 de MCF-7.**

Para correlacionar la clasificación de los tumores con la farmacología, los tumores son clasificados (sección 2.1) y se realizan a continuación unos experimentos *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de MCF-7 con un ADC que

comprende una porción de anticuerpo que se dirige al IGF-1R que es conocido que se interioriza y una porción de fármaco que consiste en una auristatina (sección 2.2).

2.:1: detección por inmunohistoquímica de la expresión de IGF-1R en el modelo de xenoinjerto de MCF-7.

Se desparafinan unas secciones de tejido de xenoinjerto de MVF-7, se rehidratan y se disponen en un amortiguador de recuperación diana 1X (Dako S1699) en un baño de ebullición precalentado a 98°C para una recuperación de epítipo inducida por calor a 98°C durante 40 minutos a continuación 20 minutos adicionales en un amortiguador de recuperación diana. Tras 3 lavados en solución salina con amortiguador Tris-tween 20 al 0.05% (TBS-T) (Dako S3006) se bloquea la actividad de peroxidasa endógena utilizando un reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako K4007) durante cinco minutos antes de la incubación con anticuerpo monoclonal 816C12 (a 5 µg/ml) o IgG1 de ratón/kappa (5 µg/ml, X0931, Dako) como control negativo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavan con TBS-T y se incuban con Envision (Dako) durante 30 minutos. Se utiliza diaminobenzidina para el desarrollo de un producto de reacción de reacción marrón (Dako K3468). Los portaobjetos se sumergen en hematoxilina durante 2 minutos para una contratinción (Dako S3309).

El anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R 816C12 tiñe de manera diferente la membrana celular de MCF-7. En este procedimiento de IHC, el producto de reacción marrón correlaciona con la tinción positiva de la membrana celular y la carencia de producto de reacción marrón correlaciona con la tinción negativa y la no visualización de la membrana celular. Utilizando el algoritmo de membrana, la puntuación para la tinción de las células tumorales de MCF-7 es de 3+ (figura 2A). Utilizando el anticuerpo G11 (Roche Ventana) o los anticuerpos anti-IGF-1R AF-305 (R&D system), la sección del mismo tumor puntúa 2+ (figura 2B y 2C respectivamente).

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

Se evalúa el ADC anti-IGF-1R *in vivo*, en el modelo de xenoinjerto de MCF-7.

Se realizan todos los procedimientos de animales según las normas de la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de animales utilizados con fines científicos. El protocolo es aprobado por el Animal Ethical Committee del Pierre Fabre Institute. Se inyectan cinco millones de células de MCF-7 subcutáneamente en ratones Swiss/desnudos de 7 semanas. Antes de la inyección de células, se implantan gránulos de estrógeno (Innovative Research of America) en el costado izquierdo en ratones para liberar estrógenos necesarios para el crecimiento *in vivo* de los tumores de MCF-7.

Veinte días después del implante de células de MCF-7, cuando los tumores alcanzan un tamaño medio de 120-150 mm<sup>3</sup>, los animales se dividen en grupos de 6 ratones según un aspecto y tamaño de tumor. Se inocula ADC anti-IGF-1R mediante inyecciones intraperitoneales para un ciclo de 6 inyecciones cada cuatro días (Q4d4). Se monitoriza diariamente el estado de salud de los animales. Se mide el volumen del tumor dos veces a la semana con un calibrador electrónico hasta el final del estudio. Se calcula el volumen del tumor con la fórmula siguiente:  $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{altura}$ . Se evalúa la toxicidad siguiendo al peso de los animales tres veces por semana. Los análisis estadísticos se realizan en cada medida utilizando una prueba Mann-Whitney.

La inyección de ADC anti-IGF-1R inhibe de manera significativa e incluso induce una regresión de crecimiento tumoral completa (figura 3) como se espera 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 de SBC-5.**

Para correlacionar la clasificación de los tumores con la farmacología, los tumores son clasificados (sección 3.1) y a continuación se realizan unos experimentos *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de 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 auristatina (sección 3.2).

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

Se analiza el nivel de IGF-1R utilizando el mismo protocolo descrito en la sección 2.1 el ejemplo 2 anterior.

Cuando se detecta el IGF-1R con el 816C12, se detectan unos niveles bajos (1+). (Figura 4A). Cuando se detecta el IGF-1R con el anticuerpo G11 (Roche Ventana) o los anticuerpos anti-IGF-1R AF-305 (R&D System), se puntúan las secciones del mismo tumor 3+ (figuras 4B y 4C respectivamente).

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

El ADC anti-IGF-1R se evalúa *in vivo*, en el modelo de xenoinjerto de SBC-5.

Se realizan todos los procedimientos de animales según las normas de la Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales con fines científicos. El protocolo es aprobado por el Animal Ethical Committee del Pierre Fabre Institute. Se inyectan cinco millones de células de SBC-5 subcutáneamente en ratones atímicos de 7 semanas. Veinte días después del implante de células, cuando los tumores alcanzan un tamaño medio de 150 mm<sup>3</sup>, los animales se dividen en grupos de 6 ratones según un aspecto y tamaño del tumor. Se inocula ADC anti-IGF-1R mediante inyecciones intraperitoneales para un ciclo de 6 inyecciones cada cuatro días (Q4d6). Se monitoriza diariamente el estado de salud de los animales. Se mide el volumen del tumor dos veces a la semana con un calibrador electrónico hasta el final del estudio. Se calcula el volumen del tumor con la fórmula siguiente:  $\pi/6 \times$  longitud x anchura x altura. Se evalúa la toxicidad siguiendo al peso de los animales tres veces por semana. Los análisis estadísticos se realizan en cada medida utilizando una prueba Mann-Whitney.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT  
 JOUHANNEAUD, Alexandra  
 5  
 <120> NUEVO ANTICUERPO IGF-1R Y SU UTILIZACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER  
 <130> B370173D34866  
 10 <150> EP 15305642.9  
 <151> 2015-04-27  
 <160> 10  
 15 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 20 <213> artificial  
 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena pesada, CDR-H1  
 25 <400> 1  
 Gly His Thr Phe Thr Ser Tyr Val  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 8  
 30 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena pesada, CDR-H2  
 35 <400> 2  
 Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr  
 1 5  
 <210> 3  
 40 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 45 <223> 816C12 I-4894, cadena pesada, CDR-H3  
 <400> 3  
 Val Ser Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Gly Arg Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10  
 50 <210> 4  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 55 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena ligera, CDR-L1  
 <400> 4  
 Gln Asp Ile Asn Asn Tyr  
 1 5  
 60 <210> 5  
 <211> 3

ES 2 875 753 T3

<212> PRT  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <223> 816C12 I-4894, cadena ligera, CDR-L2  
  
 <400> 5  
 Tyr Thr Ser  
 1  
 10  
 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena ligera, CDR-L3  
  
 <400> 6  
 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr  
 20 1 5  
  
 <210> 7  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 25 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena pesada, dominio variable  
 30 <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  
  
 Val Leu His Trp Met Lys Arg Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
  
 Gly Tyr Ile Asn Pro His Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Asn Phe  
 50 55 60  
  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
  
 Met Glu Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
  
 Val Ser 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  
 35 <210> 8  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena ligera, dominio variable

ES 2 875 753 T3

<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 Asn Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

5 <210> 9  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena pesada, dominio variable

<400> 9  
 gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcctgcaagg cttctggaca cacattcact agctatgttt tgcactggat gaagcggaag 120  
 cctgggcagg gccttgagt gattggatat attaactctc acaatgatgt tactaagtac 180  
 aatgagaatt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatactccag cacagtctac 240  
 atggaggtca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtgt attactgtgt aagtaccgcc 300  
 tactatggtt acggccggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 360  
 tca 363

15 <210> 10  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> 816C12 I-4894, cadena ligera, dominio variable

<400> 10

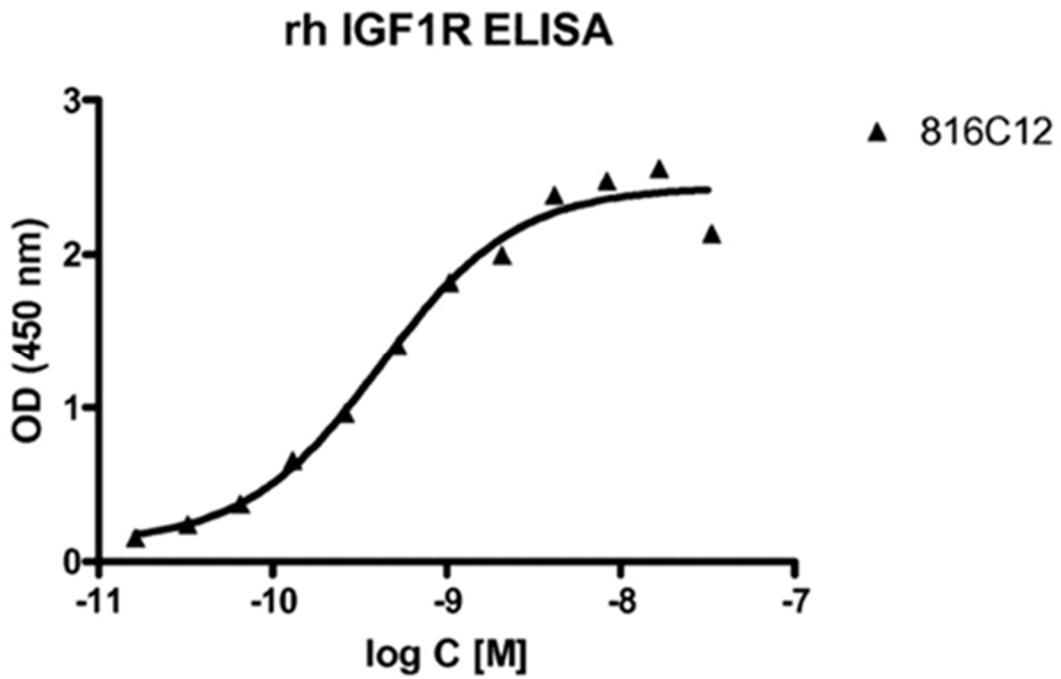
# ES 2 875 753 T3

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca gggcaagtca ggacattaac aattatttaa actggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtctcatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa	240
gaagatattg ccacttattt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtgga	300
ggcaccaagc tggaatcaa a	321

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo IGF-1R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado por que comprende:
  - 5 i) una cadena pesada con CDR-H1 de secuencia SEC ID n°: 1, CDR-H2 de secuencia SEC ID n°: 2 y CDR-H3 de secuencia SEC ID n°: 3; y
  - ii) una cadena ligera con CDR-L1 de secuencia SEC ID n°: 4, CDR-L2 de secuencia SEC ID n°: 5 y CDR-L3 de secuencia SEC ID n°: 6.
- 10 2. Anticuerpo IGF-1R según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende un dominio variable de cadena pesada de secuencia SEC ID n°: 7 y un dominio variable de cadena ligera de secuencia SEC ID n°: 8.
- 15 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, 2014, con el número I-4894.
- 20 4. Utilización *in vitro* o *ex vivo* de un anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la detección de células tumorales que expresan IGF-1R o para determinar el nivel de expresión de células tumorales que expresan IGF-1R.
- 25 5. Utilización *in vitro* o *ex vivo* de un anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para diagnosticar un tumor que expresa IGF-1R.
6. Método para detectar *in vitro* o *ex vivo* la presencia y/o la ubicación 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
  - 30 (b) detectar la unión de dicho anticuerpo IGF-1R, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, con dicha muestra biológica.
- 35 7. 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
  - 40 (b) cuantificar el porcentaje de células que expresan IGF-1R en la muestra biológica.
- 45 8. 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.
- 50 9. Método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la puntuación de IGF-1R de las 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;
  - 55 (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
  - 60 (c) puntuar las células tumorales o el tumor comparando el nivel cuantificado obtenido en la etapa (b) con una escala apropiada sobre la base de dos parámetros que son la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas.
- 65 10. Método para determinar si un trastorno oncogénico es susceptible de tratamiento con un fármaco de anticuerpo contra 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 de acuerdo con el método según la reivindicación 9, y
- 5 (b) determinar que, si el estado de IGF-1R de las células tumorales o el tumor es IGF-1R(+), el trastorno oncógeno es susceptible de tratamiento con un fármaco de anticuerpo contra IGF-1R.
11. Método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la eficacia de un régimen terapéutico concebido para aliviar un cáncer que expresa IGF-1R en un sujeto que padece dicho trastorno, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 (a) determinar un primer nivel de expresión de IGF-1R según la reivindicación 8 en una primera muestra biológica, correspondiendo dicha primera muestra biológica al primer punto temporal de dicho tratamiento;
- 15 (b) determinar un segundo nivel de expresión de IGF-1R según la reivindicación 8 en una segunda muestra biológica, correspondiendo dicha segunda muestra biológica a un punto temporal posterior, segundo, de dicho tratamiento;
- (c) calcular la relación 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
- 20 (d) determinar que la eficacia de dicho régimen terapéutico es elevada cuando la relación de la etapa (c) es superior a 1; o determinar que la eficacia de dicho régimen terapéutico es baja cuando la relación de la etapa (c) es inferior o igual a 1.
12. Método para seleccionar un paciente de cáncer que se predice que se beneficia o no de la administración de una cantidad terapéutica de un fármaco de anticuerpo contra IGF-1R, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 25 (a) determinar el nivel de expresión de IGF-1R de acuerdo con el método según la reivindicación 8;
- (b) comparar el nivel de expresión de la etapa previa (a) con un nivel de expresión de referencia; y
- 30 (c) seleccionar el paciente como que se predice que se beneficia de un tratamiento con un fármaco de anticuerpo contra IGF-1R, si la relación del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia es superior a 1; o
- 35 (d) seleccionar el paciente como que no se predice que se beneficia de un tratamiento con un fármaco de anticuerpo contra IGF-1R, si la relación del nivel de expresión obtenido en (a) con respecto al nivel de expresión de referencia es inferior o igual a 1.
13. 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.
- 40



	816C12
Respuesta sigmoideal a la dosis (pendiente variable)	
Valores de mejor ajuste	
INFERIOR	0.1163
SUPERIOR	2.438
LOGEC50	-9.380
PENDIENTE DE HILL	1.116
EC50	4.173e-010

**FIGURA 1**

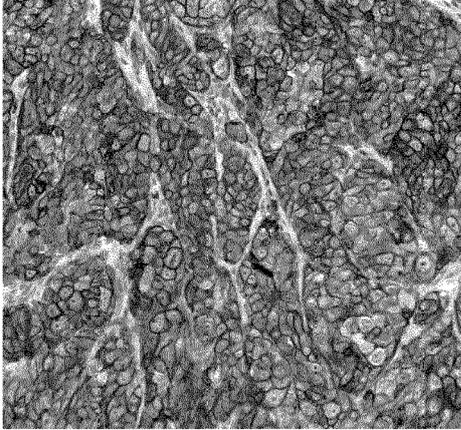


Figura 2A

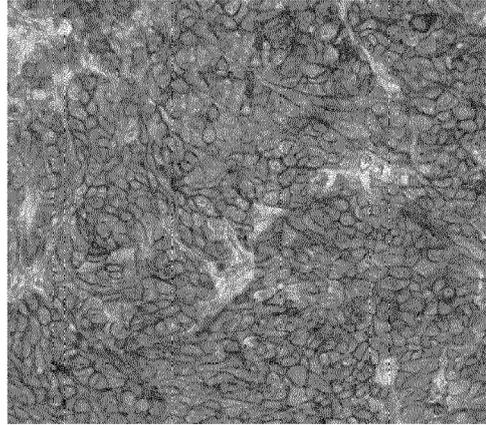


Figura 2B

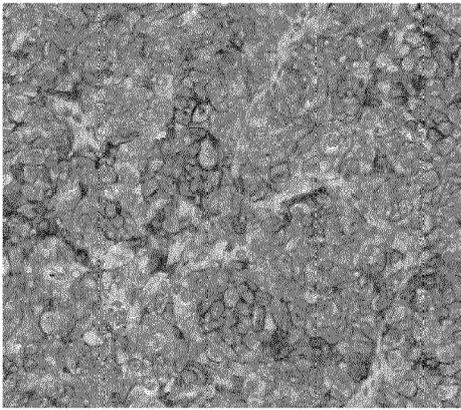


Figura 2C

**FIGURAS 2A-2C**

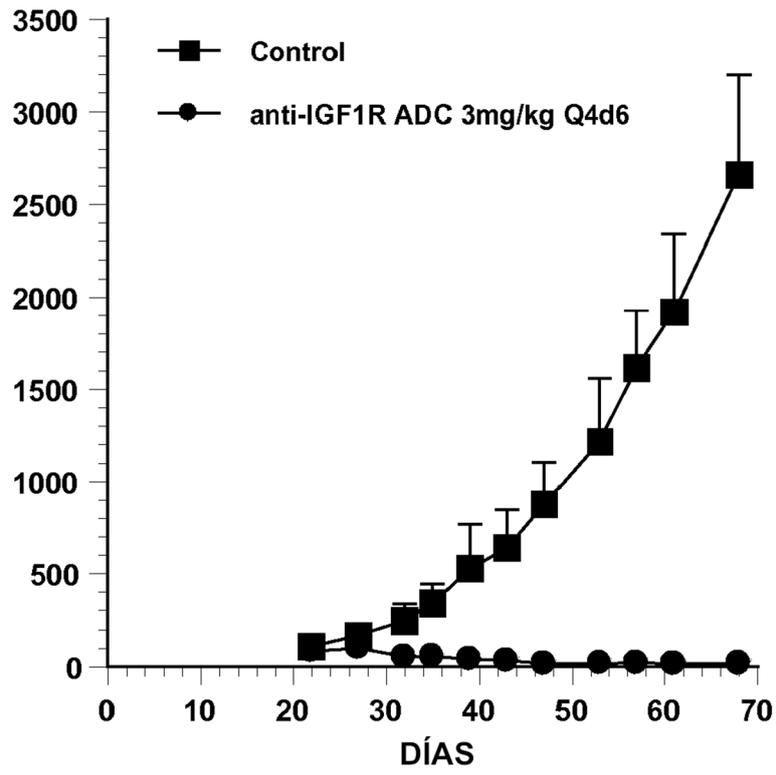


FIGURA 3

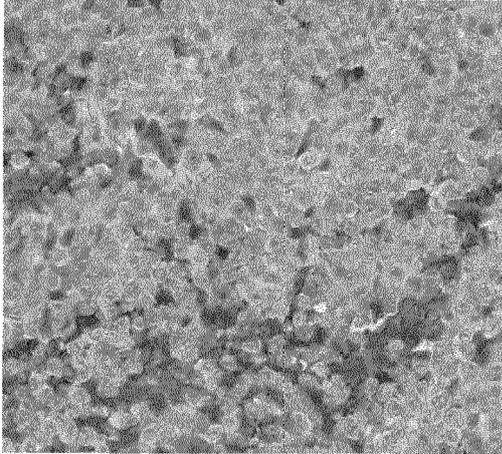


Figura 4A

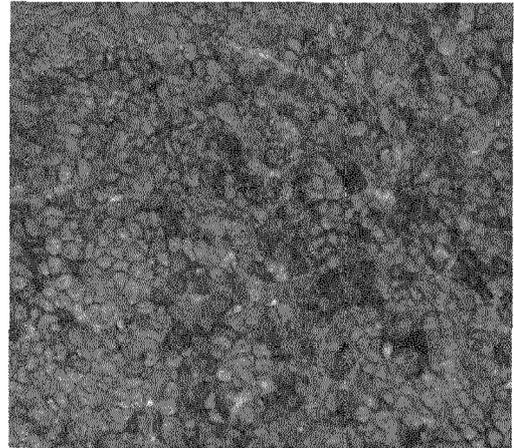


Figura 4B

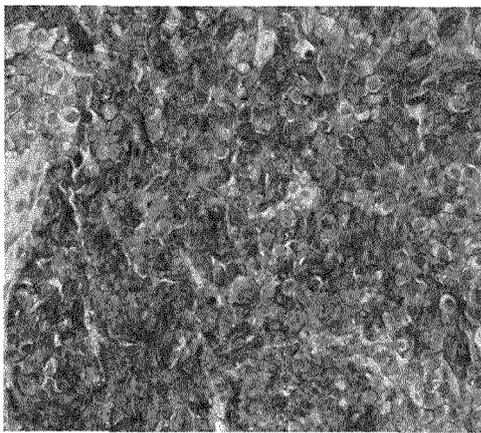


Figura 4C

**FIGURAS 4A-4C**

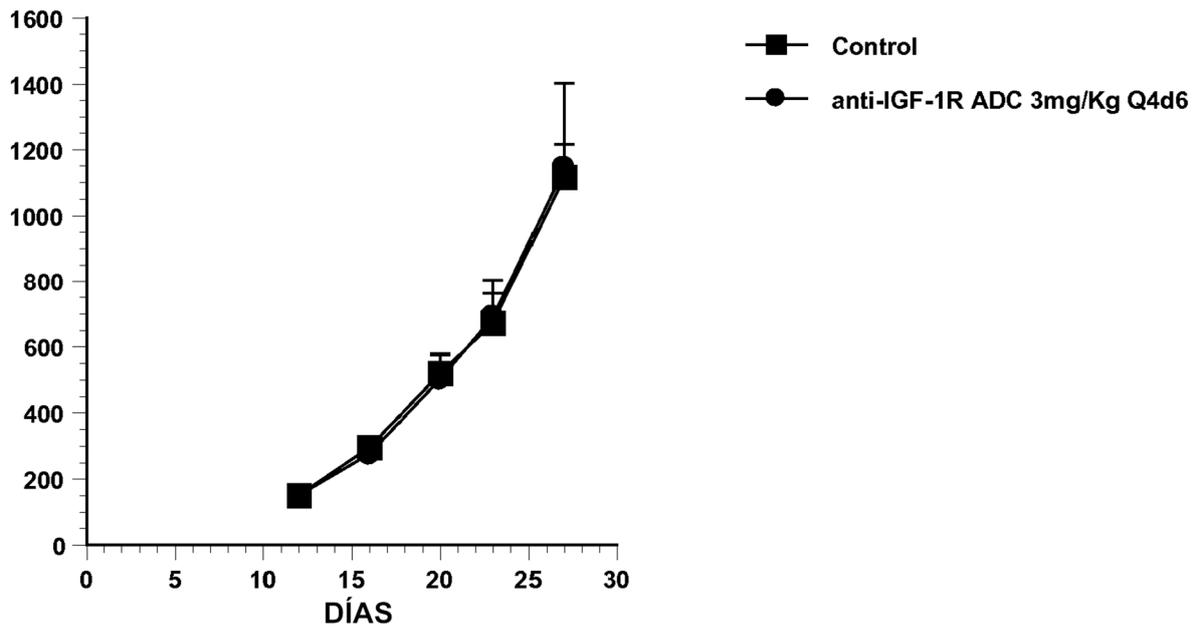


FIGURA 5