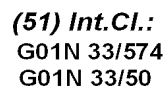




(22) Data de Depósito: 29/05/2007
(43) Data da Publicação: 24/07/2012
(RPI 2168)



(87) Publicação Internacional: WO 2007/141626de
13/12/2007

[illegible]

"MÉTODOS PARA PREVER E MONITORAR A EFICÁCIA DA TERAPIA ANTAGONISTA DE IGF-1R"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5 A invenção atual refere-se aos campos de oncologia e teste de diagnóstico, e mais especialmente, a métodos para a pesquisa de câncer e para a previsão e monitoramento de respostas ao tratamento de quimioterapia, recorrência de câncer ou semelhante.

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) é um polipeptídeo 7,5 kD que circula no plasma em concentrações elevadas e é detectável na maioria dos tecidos. O IGF-1, que estruturalmente é semelhante à insulina, estimula a diferenciação de células e a proli-
10 feração de células, e é requerido pela maioria dos tipos de células de mamíferos para a proliferação prolongada. Estes tipos de células incluem, entre outras, fibroblastos diplóides humanos, células epiteliais, células macias de músculos, linfócitos T, células neurais, células mielóides, condrocitos, osteoblastos, e células tronco de medula de osso.

A primeira etapa na rota de transdução levando à proliferação ou diferenciação ce-
15 lular estimulada por IGF-1 é a ligação de IGF-1 ou IGF-2 (ou insulina em concentrações suprafisiológicas) no receptor IGF-1 (IGF-1R). O IGF-1R pertence à família de receptores de fator de crescimento da tirosina quinase (Ullrich et al, Cell 61: 203 - 212, 1990), e é estruturalmente semelhante ao receptor de insulina (Ullrich et al., EMBO J. 5 : 2503 - 2.512,1986).

Estudos epidemiológicos sugerem que os níveis normais elevados no final do IGF-1
20 aumentam o risco de cânceres, tais como de pulmão, seio, próstata e coloretal, comparado com indivíduos com níveis de IGF-1 na extremidade inferior do normal. Além disso, existe uma evidência considerável da função do IGF-1 e/ou IGF-1R na manutenção das células de tumor in vitro e in vivo. Os níveis de IGF-1R são elevados em tumores do pulmão (Kaiser et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 119: 665 - 668,1993; Moody et al., Life Sciences 52: 1161 -
25 1173, 1993; Macauley et al., Cancer Res., 50: 2511 - 2517,1990), dos seios (Pollack et al., Cancer Lett. 38: 223 - 230,1987; Foekens et al., Cancer Res. 49: 7002 - 7.009,1989; Arteaga et al., J. Clin. Invest. 84: 1418 - 1423,1989), próstata e intestino grosso (Remaole-Bennet et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 75: 609 - 616, 1992; Guo et al., Gastroenterol. 102: 1101 - 1.108,1992). A expressão da desregulação do IGF-1 no epitélio da próstata leva à neoplasia
30 em camundongos transgênicos (DiGiovanni et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 97: 3455 - 3460, 2000). Além disso, o IGF-1 parece ser um estimulador autocrino de gliomas humanos (Sandberg-Nordqvist et al., Cancer Res. 53 (11): 2475 - 78,1993), enquanto o IGF-1 mostrou estimular o crescimento de fibrossarcomas que superexpressam o IGF-1R (Butler et al., Cancer Res. 58: 3021 - 3027,1998). Para uma revisão do papel que a interação IGF-1/IGF-1R
35 tem no crescimento de vários tumores humanos, ver Macaulay, Br. J. Cancer, 65: 311 - 20,1992.

O uso de vetores de expressão antisenso ou oligonucleotídeos antisenso para o IGF-1R RNA, mostrou que a interferência com o IGF-1R leva à inibição do crescimento de

célula mediado por IGF-1 (ver, por exemplo, Wraight et al., *Nat. Biotech.* 18: 521 - 526, 2000). O crescimento também pode ser inibido utilizando-se análogos de peptídeos de IGF-1 (Pietrkowski et al., *Cell Growth & Diff.* 3: 199 - 205, 1992; Pietrkowski et al., *Mol Cell Biol.* 12: 3883 - 3889, 1992), ou um vetor que expressa um antisenso RNA para o IGF-1 RNA (Trojan et al., *Science* 259: 94 - 97, 1992). Além disso, os anticorpos para o IGF-1R (Arteaga et al., *Breast Canc. Res. Treatm.* 22: 101 - 106, 1992; e Kalebic et al., *Cancer Res.* 54: 5531 - 34, p 994), e mutantes negativos dominantes de IGF-1R (Prager et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91: 2181 - 85, 1994; Li et al., *J. Biol. Chem.* 269: 32.558 - 2564, 1994; Jiang et al., *Oncogene* 18: 6071 - 6077, 1999), podem reverter o fenotipo transformado, inibir a tumorigenese, e induzir a perda do fenotipo metastático.

O IGF-1 também é importante na regulação da apoptose. A apoptose, que é a morte celular programada, é envolvida em uma grande variedade de processos de desenvolvimento, incluindo a maturação do sistema imune e nervoso. Além da sua função no desenvolvimento, a apoptose também tem sido envolvida como uma proteção celular importante contra a tumorigenese (Williams, *Cell* 65: 1097 - 1098, 1991; Lane, *Nature* 362: 786 - 787, 1993). A eliminação do programa apoptótico poderá contribuir para o desenvolvimento e a progressão de malignidades.

O IGF-1 é protegido da apoptose pela retirada da citoquina em células hematopoiéticas dependentes de IL-3 (Rodriguez-Tarduchy, G. et al., *J. immunol.* 149: 535 - 540, 1992), e da retirada de soro em células de ratos 1/mycER (Harrington, E. et al., *EMBO J.* 13: 3286 - 3295, 1994). A demonstração de que os fibroblastos controlados por c-myc são dependentes do IGF-1 para a sua sobrevivência sugere que existe uma função importante para o receptor de IGF-1 na manutenção das células de tumores, através especificamente da inibição da apoptose, uma função diferente dos efeitos proliferativos de IGF-1 ou de IGF-1R.

Os efeitos protetores de IGF-1 sobre a apoptose são dependentes de se ter o IGF-1R presente nas células para a interação com o IGF-1 (Resnicoff et al., *Cancer Res.* 55: 3739- 41, 1995). A confirmação de uma função anti-apoptótica do IGF-1R na manutenção de células de tumor foi também apresentada através de um estudo utilizando-se oligonucleotídeos antisenso para o IGF-1R que identificaram uma relação quantitativa entre os níveis de IGF-1R, a extensão da apoptose e o potencial tumorigenico de um tumor de rato singênico (Rescinoff et al., *Cancer Res.* 55: 3739 - 3741, 1995). Descobriu-se que o IGF-1R super-expressado protege as células de tumor in vitro da apoptose induzida por etopisídeo (Sell et al., *Cancer Res.* 55: 303 -06, 1995) e, mesmo mais dramaticamente, que uma redução nos níveis de IGF-1R abaixo dos níveis do tipo selvagem provocou a apoptose maciça de células de tumor in vivo (Resnicoff et al., *Cancer Res.* 55: 2463 - 69, 1995).

Alguns estudos sugerem que os níveis de IGF-1R são correlacionados com a avaliação clínica. Em modelos de tumores, o IGF-1R modula a proliferação, sobrevivência e me-

tástase das células, e induz resistência às terapias visadas. A inibição do IGF-1R aumenta significativamente a atividade dos agentes citotóxicos (Cohen, B. et al., Clin. Cancer Res. 11 (5): 2063 - 73). A inibição da sinalização do IGF-1R parece portanto ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas terapias para o câncer.

5 Tumores malignos de tecidos epiteliais são a forma mais comum de câncer e são responsáveis pela maioria das mortes relacionadas com câncer. Por causa do progresso no tratamento cirúrgico destes tumores, a mortalidade é cada vez mais ligada à metástase prematura e à recorrência, que com frequência está oculta no momento do primeiro diagnóstico (Racila et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:4589 - 94, 1998; Pantel et al., J. Nat'l Cancer Inst. 91 (13): 1113 - 24, 1999). Por exemplo, o local anatómico remoto de alguns órgãos faz com que seja pouco provável que tumores naqueles órgãos sejam detectados antes de-
 10 les terem invadido as estruturas vizinhas e crescido mais do que 1 cm. Mesmo com relação aos cânceres do seio, 12 - 37% de tumores pequenos de câncer do seio (< 1 cm) detectados por mamografia já produziram metástase no diagnóstico (Chadha M. et al., Cancer 73 (2): 350 -3, 1994).

Células circulantes de tumor ("CTCs") são células de origem epitelial que estão presentes na circulação de pacientes com malignidades sólidas diferentes. Elas são derivadas de clones do tumor primário e são malignas (ver Fehm et al., Clin. Cancer Res. 8: 2073 - 84, 2002). Foi acumulada na literatura evidência mostrando que as CTCs podem ser consi-
 20 deradas como um diagnóstico independente para a progressão de câncer de carcinomas (Beitsch & Clifford, Am. J. Surg. 180 (6): 446 - 49, 2000 (seios); Feezor et al., Ann. Oncol. Surg. 9 (10): 944 - 53, 2002 (colorectal); Ghossein et al., Diagn. Mol. Pathol. 8 (4): 165 - 75, 1999 (melanoma, próstata, tireóide); Glaves, Br. J. Cancer 48: 665 - 73, 1983 (pulmão); Matsunami et al., Ann. Surg. Oncol. 10 (2):171 - 5, 2003 (gástrico); Racila et al., 1998; Pantel et
 25 al., 1999).

A detecção e a contagem de células circulantes de tumor é importante para o tratamento do paciente por várias razões. Elas poderão ser detectáveis antes do tumor primário, dessa forma permitindo um diagnóstico no estágio inicial. Elas são reduzidas em resposta à terapia, e assim sendo a habilidade de contar as CTCs permite que se monitore a efeti-
 30 vidade de um determinado regime terapêutico. Elas podem ser usadas como uma ferramenta para monitorar a recorrência em pacientes sem nenhuma doença mensurável no tratamento suplementar. Por exemplo, descobriu-se que as CTCs estão presentes em 36% dos pacientes com câncer do seio 8 a 22 anos após a mastectomia, aparentemente de micrometástases (depósitos de células de tumor individuais ou aglomerados muito pequenos de células neoplásticas). Meng et al., Clin. Can. Res. 10(24): 8152 - 62, 2004.

Alem disso, as CTCs poderão ser usadas para preverem a sobrevivência livre de progressão (PFS) e a sobrevivência geral (OS), porque a presença/número de células circu-

lantes de tumor em pacientes com carcinoma metastático mostrou ser correlacionada tanto com o PFS como com o OS. Ver, por exemplo, Cristofanilli et al., J. Clin. Oncol. 23 (1): 1420 - 1430, 2005; Cristofanilli et al., N. Engl. J. Med. 351 (8): 781 - 791, 2004.

No entanto, permanece a necessidade de ensaios rápidos e confiáveis que sejam mais sensíveis do que a mera detecção de CTCs.

RESUMO DA INVENÇÃO

A invenção atual é direcionada para um método para prever a eficácia da terapia antagonista de IGF-1R em um paciente, que é composto das etapas de: a) obtenção de um espécime biológico do paciente; b) a preparação de uma amostra, onde o espécime biológico é misturado com um ligando de reage especificamente com as células de tumor, para a exclusão substancial de outros componentes da amostra; c) o contato da amostra com pelo menos um reagente que especificamente é ligado nas células epiteliais; d) o contato da amostra com um agente tendo uma afinidade de ligação com receptores de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) nas células; e e) a análise da amostra para se determinar a presença de IGF-1R de expressão de células de tumor, a presença de IGF-1R de expressão de células do tumor na amostra sendo preditiva da eficácia da terapia antagonista de IGF-1R no paciente.

A invenção atual é também direcionada para um método para monitorar a eficácia de uma terapia antagonista ao IGF-1R em um paciente, que é composto das etapas de: a) obtenção de um primeiro espécime biológico do paciente; b) a preparação de uma primeira amostra, onde o primeiro espécime biológico é misturado com um ligando que reage especificamente com as células de tumor, para a exclusão substancial de outros componentes da amostra; c) o contato da primeira amostra com pelo menos um reagente que é especificamente ligado nas células epiteliais; d) o contato da primeira amostra com um agente tendo afinidade de ligação pelos receptores de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) nas células; e) a análise da primeira amostra para se determinar a presença e a quantidade de IGF-1R de expressão de células de tumor; f) a administração ao paciente de uma terapia antagonista ao IGF-1R; g) após a administração da terapia antagonista ao IGF-1R, a obtenção de um segundo espécime biológico do paciente; h) a preparação de uma segunda amostra de um segundo espécime biológico, onde o segundo espécime biológico é misturado com o ligando que reage especificamente com as células de tumor, e a execução das etapas c) - e) na segunda amostra; e i) a comparação do número de IGF-1R de expressão de células de tumor na primeira amostra com o número de IGF-1R de expressão de células de tumor na segunda amostra, com um número menor na segunda amostra sendo indicativo da eficiência da terapia antagonista ao IGF-1R no paciente.

Em uma realização preferida, a terapia antagonista ao IGF-1R é um anticorpo anti-IGF-1R.

A invenção atual é adicionalmente direcionada para um conjunto para a pesquisa de uma amostra do paciente em relação à presença de IGF-1R que expressam células circulantes de tumor, compostas de: a) nanopartículas magnéticas revestidas compostas de um material de núcleo magnético, um material de revestimento de base de proteína, e um anticorpo que é ligado especificamente a um determinante característico das células de tumor, o anticorpo sendo ligado, diretamente ou indiretamente, no referido material de revestimento básico; b) um corante específico da célula para a exclusão da análise dos componentes da amostra diferentes das células de tumor; e c) pelo menos um agente marcador detectável tendo uma afinidade de ligação pelo IGF-1R.

Com o que foi dito anteriormente e outros objetivos, vantagens e características da invenção que ficarão aparentes daqui por diante, a natureza da invenção poderá ser entendida mais claramente através de referência à seguinte descrição detalhada da invenção, às figuras, e às reivindicações anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é uma superposição de histogramas de marcação de IGF-1R-ficoeritrina de várias linhas de células.

A figura 2 é uma coleção de imagens fluorescentes de microscópio de células de câncer de seio marcadas MCF-7 (painel A) e células T-24 de bexiga (painel B).

A figura 3 é uma coleção de imagens fluorescentes de microscópio de células circulantes de tumor em potencial.

A figura 4 é uma representação gráfica do número total de células circulantes de tumor e de células circulantes de tumor de IGF-1R-positivo de quatro pacientes tratados com um anticorpo anti-IGF-1R.

A figura 5 é uma representação gráfica do número total de células circulantes de tumor e de células circulantes de tumor de IGF-1R-positivo de 4 pacientes tratados com um anticorpo anti-IGF-1R em combinação com docetaxel.

A figura 6 é uma representação gráfica do número total de células circulantes de tumor e de células circulantes de tumor de IGF-1R-positivo de 4 pacientes tratados com um anticorpo anti-IGF-1R em combinação com paclitaxel e carboplatin.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A não ser que seja definido de outra forma aqui, os termos científicos e técnicos utilizados em conexão com a invenção atual devem ter os significados que são comumente entendidos por aqueles com conhecimento normal na arte. Além disso, a não ser que seja requerido de outra forma pelo contexto, os termos no singular devem incluir plurais e os termos no plural devem incluir o singular.

A cada ano nos Estados Unidos, são diagnosticados mais de um milhão de casos novos de câncer; aproximadamente 1 em cada 5 mortes neste país é provocada por câncer

ou complicações associadas com o seu tratamento. São continuamente direcionados esforços consideráveis para a melhoria do tratamento e diagnóstico desta doença. A maior parte dos pacientes de câncer não são mortos pelo seu tumor primário; ao contrário, eles sucumbem à metástase: colônias múltiplas de tumor espalhadas estabelecidas pelas células malignas que se desprendem das próprias do tumor original e viajam através do corpo, com frequência para locais distantes. Infelizmente, as colônias metastáticas, com frequência, são mais difíceis de serem detectadas e eliminadas do que o tumor primário e com frequência é impossível tratar-se todas elas com sucesso. A habilidade das células malignas para a metástase permanece um dos maiores obstáculos para o tratamento do câncer e poderia ser acelerada pelo receptor IGF-1. Ver, por exemplo, Bahr et al., Growth Factors 23: 1- 14, 2005.

Com base na complexidade do câncer e na metástase do câncer e da frustração no tratamento de pacientes de câncer ao longo dos anos, têm sido feitas várias tentativas para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para orientar o tratamento e monitorar os efeitos de tal tratamento sobre a metástase ou relapso. Tais testes, presumivelmente, poderiam também ser utilizados para a pesquisa do câncer, substituindo testes relativamente grosseiros, tais como a mamografia para tumores dos seios ou exames retais digitais para cânceres da próstata.

Em vista do conhecimento da relação entre IGF-1 e IGF-1R para certos cânceres, foram feitos estudos para a avaliação do efeito dos anticorpos anti-IGF-1R na quantidade de células circulantes de tumor e a sua expressão IGF-1R, assim como a eficácia clínica dos anticorpos. Foi agora desenvolvido um ensaio para a detecção e contagem de IGF-1R de expressão de células circulantes de tumor (CTCs de IGF-1R-positivo) que é útil no diagnóstico e no tratamento de câncer, e é superior aos métodos da arte anterior envolvendo CTCs. O ensaio poderá contribuir para um melhor entendimento das funções biológicas do receptor IGF-1. Por exemplo, embora tenha sido postulado que os níveis elevados de IGF-1R são necessários para provocar o fenotipo invasivo de células de tumor/metastático, a relação entre os níveis de expressão de IGF-1R e o potencial metastático ainda não foi completamente elucidada. Descobriu-se agora que pacientes com contagens elevadas de CTC com IGF-1R-positivo parecem ter tumores mais agressivos, conforme é evidenciado pela rápida progressão da doença. Uma relação potencial entre a expressão aumentada de IGF-1R e o potencial metastático poderia portanto ser a base para a detecção de CTCs de IGF-1R - positivo como uma previsão de avaliação e/ou intervenção terapêutica pobre.

Inicialmente, os métodos de ensaio CTC-IGF-1R da invenção atual são úteis para a detecção prematura de um tumor, ou para confirmar um diagnóstico. Eles também poderão ser usados para a avaliação de prognósticos.

Os métodos da invenção atual são também úteis para o planejamento do tratamen-

to. Descobriu-se que pacientes com células circulantes de tumor IGF-1R-positivo antes do tratamento são mais propensas a responder à terapia antagonista IGF-1R do que aqueles que não as tem. Pesquisando-se pacientes em relação a anticorpos de IGF-1R -positivo antes do início de qualquer tratamento, é possível uma pré-seleção de uma população mais propensa a responder á terapia antagonista de IGF-1R e planejar um regime de tratamento adequado. Os usos em potencial e os ensaios CTC-IGF-1R como biomarcadores de anticorpos anti-IGF-1R poderia incluir a identificação de uma dose biológica ótima, a seleção da dose e do regime de tratamento e a determinação da duração do tratamento.

Descobriu-se que existe uma boa correlação entre as alterações no nível de CTCs de IGF-1R-positivo no sangue com a quimioterapia e o status clínico. Em vista desta correlação, é também possível avaliar-se a resposta do paciente ao tratamento, ou a progressão da doença utilizando-se os métodos de ensaio da invenção atual. A medição de receptores IGF-1 nas células circulantes de tumor produz um ponto final real farmacodinâmico (PD). Tão logo seja iniciado o tratamento, a medição de IGF-1R nas células de tumor pode ser usada para se determinar se foi alcançada a inibição máxima do objetivo sem se alcançar a dose máxima tolerada (MTD). O desenvolvimento de resistência a um determinado tratamento também pode ser monitorado. Um benefício adicional da invenção atual é que o efeito do fármaco pode ser determinado com mais freqüência medindo-se as CTCs do que através de meios tradicionais.

Finalmente, os métodos da invenção atual poderão também ser utilizados para a detecção da recorrência de um tumor, mesmo na ausência de sintomas clínicos.

Os métodos da invenção atual poderão ser utilizados em conjunto com o diagnóstico e/ou o tratamento de malignidades não hematológicas, incluindo câncer do seio, próstata, ovários, pulmões e intestino grosso, especialmente câncer dos pulmões de células não pequenas (NSCLC) e câncer da próstata refratário a hormônios (HRPC).

A pesquisa de pacientes com tipos múltiplos de tumor indica que as CTCs e as CTCs de IGF-1R-positivo são detectadas com freqüência nos pacientes HRPC. A identificação desta células nos HRPC poderá ter implicações de prognóstico ou terapêuticas. De fato, em um estudo anterior, descobriu-se que a presença de CTCs era o parâmetro mais significativo preditivo da sobrevivência em pacientes com HRPC (Moreno et al., Urology 65: 713 - 718, 2005). Vários estudos estabeleceram a função do IGF-1R no desenvolvimento do câncer de próstata, e os dados in vitro sugerem que a expressão e/ou a atividade aumentada de IGF-1R são associadas com a progressão ao fenotipo refratário a hormônio (Hellawell et al., Cancer Res., 62: 2942 - 29 50, 2002; Chott et al., Am. J. Pathol. 155: 1271 - 1279, 1999). Em um estudo descrito aqui, os pacientes com HRPC que foram considerados com IGF-1R-positivo (i.e., pelo menos foi detectada uma CTC de IGF-1R-positivo) tinham um nível médio de PSA no soro no registro maior do que aqueles pacientes que não tinham CTCs detectá-

veis. Além disso, os níveis de contagem de PSA e de CTC e de CTC de IGF-1R-positivo eram significativamente mais elevados do que aqueles no grupo da doença mais cedo, e uma queda na contagem de CTC uma semana depois do início do tratamento com docetaxel foi reportado em dois pacientes (Moreno et al., 2005, supra). Ambos os pacientes, no entanto, progrediram, exibindo uma elevação na contagem de CTCs e de níveis de PSA, apesar das doses adicionais de docetaxel. Os estudos descritos aqui sugerem que somente as reduções prolongadas na contagem de CTCs são associadas com a resposta à terapia nos HRPC. Assim sendo, as contagens de CTC poderão produzir uma informação de prognóstico independente daquela do nível de PSA. Muito importante, os dados pré-clínicos indicam que as alterações no PSA em resposta ao tratamento com anti-IGF-1R refletem as alterações no crescimento do tumor de próstata (Wu et al., Clin. Cancer Res. 11: 3065 - 3074, 2005).

Foi também descoberto que a proporção dos que responderam à terapia combinada de anticorpo anti-IGF-1R e docetaxel era maior naqueles pacientes com CTCs detectáveis de IGF-1R-positivo no início do estudo do que naqueles nos quais estas células não foram detectadas. Além disso, respostas tardias, que não necessariamente são associadas com benefício clínico (ver, por exemplo, Petrylak et al., J. Nat'l Cancer Inst. 98: 516 - 521, 2006) foram vistos nos pacientes com IGF-1R -CTC negativo. Estes dados são sugestivos de um uso potencial de contagem de IGF-1R CTC para a identificação de pacientes HRPC que poderiam se beneficiar da terapia anti-IGF-1R.

Os métodos da invenção atual poderão ser usados no planejamento e/ou monitoração de tratamento com vários compostos quimioterapêuticos que inibem a sinalização de IGF-1R. São especialmente preferidos os anticorpos anti-IGF-1R, tais como aqueles descritos na patente americana de número 7.037.498 e na publicação de solicitação de patente americana de número 2005/0069539. Outros anticorpos anti-IGF-1R preferidos incluem F-50035 e MK-0646 (Pierre Fabre/Merck); 19D12 (Schering-Plough); R1507 (Roche/Genmab); EM-164/AVE-1642 (Immunogen/Sanofi-Aventis); IMC-A12 (ImClone Systems); AMG479 (Amgen); assim como os anticorpos descritos na solicitação internacional de patente de número WO 2006/069202; publicação de solicitação de patente americana de número 2005/0127612; publicação de solicitação de patente americana número 2005/0084906; publicação de solicitação de patente americana de número 2005/0249730; publicação de solicitação de patente americana número 2004/001891; publicação de solicitação de patente americana de número 2005/0136063; publicação de solicitação de patente americana de número 2003/0235582; publicação de solicitação de patente americana de número 2004/0265307; publicação de solicitação de patente americana de número 2004/0228859; publicação de solicitação de patente Americana número 2005/0008642; a solicitação de patente européia número 1622942; publicação de solicitação de patente americana de número

2003/0165502; e publicação de patente americana número 2005/0048050.

Outras classe de moléculas adequadas para uso com a invenção atual incluem peptídeos aptameros que se ligam especificamente ao IGF-1R, moduladores de IGF-1R de oligonucleotídeos antisenso; e inibidores de IGF-1R de moléculas pequenas. Os inibidores de IGF-1R de moléculas pequenas preferidos incluem OSI 906 (OSI Pharmaceuticals); AEW-541 (Novartis); BMS-536924 e BMS-554417 (Bristol-Myers Squibb); INSM-18 (Insmed); AG-1024 (Pfizer); XL 228 (Exelixis), picropodofilina, e aqueles apresentados na solicitação internacional de patente de número WO 2004/043962 e WO 2004/054996.

Conforme apresentado abaixo em maiores detalhes, os métodos da invenção atual envolvem a remoção seletiva de células tendo certos sítios reativos antígenos, de uma amostra de pacientes. Métodos e aparelhos para tal remoção seletiva são bem conhecidos por uma pessoa adestrada na arte. Ver, por exemplo, as patentes americanas de número 4.551.435; 4.795.698; 4.925.788; 5.108.933; e 5.200.084; e a publicação de solicitação de patente americana de número 2004 /0157271. Em uma realização preferida, as células de interesse são imunomagneticamente isoladas da amostra do paciente utilizando-se ferrofluidos. Os ferrofluidos contêm partículas finas magnéticas em uma suspensão coloidal cujo fluxo pode ser controlado por magnetos ou campos magnéticos.

Para que esta invenção possa ser melhor entendida, são apresentados os exemplos seguintes. Estes exemplos são para fins de ilustração somente e não devem ser considerados como limitando o escopo da invenção de nenhuma forma.

EXEMPLOS

Nos exemplos apresentados aqui, foram tiradas amostras de sangue em várias locais geográficos de indivíduos humanos em tubos de conservação CELLSAVE (Immunicon, Huntington Valley, PA), tubos de retirada de sangue a vácuo de 10 ml contendo um conservante de células para conservar a morfologia da célula e a expressão do antígeno de superfície das células. As amostras foram mantidas na temperatura ambiente e foram processadas conforme descrito acima dentro de 72h da colheita de sangue.

A resposta do paciente ao tratamento foi avaliada radiologicamente utilizando-se o critério de avaliação de resposta em tumores sólidos (RECIST) (ver Therasse et al., J. Nat'l Cancer Inst. 92: 205 - 216, 2000) ou, nos pacientes HRPC, utilizando-se o critério de um grupo de trabalho de antígenos específico de próstata (PSAWG) (via Bubley et al., J. Clin. Oncol. 17: 3461 - 3467, 1999).

Exemplo 1

Desenvolvimento do ensaio de células circulantes de tumor IGF-1R

Cultura de célula e reconhecimento de célula: a linha de células de câncer do seio, a linha de células da próstata PC3-9, a linha de células de bexiga T-24 e a linha de células hematopoiéticas CEM foram cultivadas em frascos contendo um meio de cultura de células

RPML- 1640 suplementado com 10% de FCS e posteriormente foram colhidas utilizando-se tripsina. As suspensões de células foram utilizadas somente quando a sua viabilidade avaliada pela exclusão de azul de triptano excedeu a 90%. Para se determinar o número real de células, uma amostra de 50 μ L de células foi permeabilizada e marcada fluorescentemente através da adição de 200 μ L de saponina contendo 0,05% de PBS e 10 μ L de anticorpo monoclonal anti-citoqueratina conjugado com ficoeritrina (PE) com uma concentração final de 0,5 μ g/ml. Depois de uma incubação de quinze minutos na temperatura ambiente, foram adicionados 200 μ L de solução tampão e 20 μ L de grânulos fluorescentes (Beckman-Coulter, Inc., Miami, FL) contendo aproximadamente um total de 20.000 grânulos. Tubos duplicados contendo somente grânulos foram passados em um citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA) até que 100% da amostra foi aspirada. Isto produziu uma estimativa precisa do número de grânulos presentes em 20 μ L. Os tubos da experiência foram então testados em triplicata no citômetro de fluxo até serem contados 10.000 grânulos em cada tubo. Utilizando-se o número conhecido de grânulos por unidade de volume, foi determinada a concentração de células. Para a detecção de IGF-1R os números de células identificadas foi estimado como sendo entre 130 e 220 em 7,5 ml de sangue.

Isolamento e contagem de CTCs: Amostras para o isolamento de células do sangue foram preparadas e analisadas utilizando-se o sistema CELLTRACKS (Immunicon, Huntingdon Valley, PA), que consiste de um sistema CELLTRACKS AUTOPREP, um conjunto reagente e o analisador CELLSPOTTER. O sistema CELLTRACKS AUTOPREP é um sistema de preparação de amostra automático para a detecção de células raras. O conjunto reagente consiste de ferrofluidos revestidos com anticorpos para enriquecer imunomagneticamente as células, um coquetel de anticorpos conjugados fluorescentemente (anticorpos conjugados com PE e alofocianina (APC) para marcar as células epiteliais e leucócitos, respectivamente) um corante nuclear, e soluções tampão para lavar, permeabilizar e recolocar em suspensão as células. Para a detecção de células de carcinoma, 7,5 ml de sangue são misturados com ferrofluidos revestidos com anticorpos diretamente contra o antígeno EpCAM associado com o tumor (molécula de adesão à célula epitelial, ou antígeno superficial da célula epitelial). Depois do enriquecimento imunomagnético, foram adicionados os anticorpos marcados com isotiocianato (FITC) de reconhecimento das citoqueratinas 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 e 19, anticorpos marcados com APC de reconhecimento do antígeno de leucócitos CD45, os anticorpos marcados com PE de reconhecimento de IGF-1R, e o corante de ácido nucleico 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI) em conjunto com uma solução tampão de impermeabilização para marcar com fluorescência as células marcadas imunomagneticamente. Depois da incubação no sistema, foi repetida a separação magnética e os reagentes de marcação em excesso foram aspirados. Na etapa final do processo, as células foram recolocadas em suspensão no dispositivo de conservação de células MAGNEST (Immunicon,

Huntington Valley, PA). Este dispositivo consiste de uma câmara e dois magnetos que orientam as células marcadas imunomagneticamente para a análise utilizando-se um microscópio fluorescente.

O MAGNEST foi colocado sobre o analisador CELLSPOTTER, um microscópio fluorescente semi-automático de quatro cores. Foram capturados quadros de imagens cobrindo a superfície inteira do invólucro para cada um dos quatro cubos de filtros fluorescentes. As imagens capturadas contendo objetos que atendiam a um critério predeterminado foram automaticamente apresentadas em um navegador da Internet do qual foi feita uma seleção final de células pelo operador. O critério para um objeto ser definido como uma CTC incluía morfologia redonda ou oval, um núcleo visível (DAPI positivo), marcação positiva para citoqueratina, e falta de expressão do CD-45 (conforme determinado pela marcação negativa CD45-APC). Os resultados da contagem de células eram sempre expressados como o número de células por 7,5 ml de sangue.

Seleção de anticorpos IGF-1R e detecção de IGF-1R em linhas de células de tumores: os anticorpos anti-IGF-1R 1H7 (conjugado PE; BD Biosciences, San Jose, CA) e 33255.111 (R&D Systems, Minneapolis, MN) foram titulados sobre células da linha de células de câncer do seio, as células MCF-7. Experiências de bloqueamento cruzado não demonstraram nenhuma inibição sugerindo que estes anticorpos se ligam aos epitopos diferentes e não competitivos do IGF-1R. E as experiências de bloqueamento cruzado com o anticorpo anti-IGF-1R humano CP-751,871 (Pfizer Inc.; ver a patente americana de número 7.037.498) mostraram que nenhum anticorpo 33255. 111 foi completamente bloqueado de células de ligação essencialmente por quantidades equimolares de CP-751,871. Estes dados demonstram que o 33255.111 e o CP-751,871 se ligam no mesmo ou em epitopos relacionados. Como a ligação do anticorpo 1H7 no IGF-1R não é bloqueada na presença do CP-751,871, o 1H7 foi escolhido para uma avaliação adicional.

A densidade do antígeno na linha de células hematopoiéticas CEM, a linha de células de câncer da próstata PC3-9, a linha de células de bexiga T-24 e a linha de células de câncer do seio MCF-7 foram avaliadas marcando-se com o anticorpo anti-IGF-1R marcado com PE 1H7 seguido por análise fluxocitométrica.

A figura 1 mostra uma superposição de histogramas da marcação IGF-1R-PE das linhas de células. A marcação das células CEM foi semelhante àquela dos controles e a densidade IGF-1R era portanto abaixo do limite de detecção. A marcação IGF-1R-PE das células PC3-9 poderia ser recolocada em dissolução pela retaguarda e as células T24 e MCF-7 claramente tinham uma marcação mais brilhante. A estimativa da densidade do antígeno foi obtida pela qualibração do citômetro de fluxo com grânulos com um número conhecido de moléculas PE. A densidade IGF-1R nas células PC3-9 era de aproximadamente 10.000 antígenos IGF-1R, nas células T-24 aproximadamente 50.000 antígenos IGF-1R e

nas células MCF-7 aproximadamente um milhão de antígenos IGF-1R.

Caracterização do ensaio IGF-1R: O ensaio standard CTC utilizando o sistema CELLTRACKS usa PE para a detecção da citoqueratina presente nas células de origem epitelial, APC para a detecção de CD 45 presente nas células de origem hematopoiética, e FITC para a detecção de reagentes específicos analíticos em CTCs definidas como células citoqueratina-positivas, nucleadas CD 45-negativas. A limitação atual de detecção dos analisadores CELLSPOTTER para a detecção de antígenos com anticorpos marcados com FITC é de aproximadamente 100.000 antígenos por célula. Para aumentar esta sensibilidade, o ensaio CTC foi reconfigurado para reduzir o limite de detecção para a detecção IGF-1R. A citoqueratina expressada em densidades elevadas sobre células epiteliais foi marcada com FITC, o que permite o uso de anticorpos anti-IGF-1R marcados com PE. Em experiências separadas, 130 a 200 células PC3-9, T-24 ou MCF-7 foram inoculadas em 7,5 ml de sangue e preparadas com reagentes de marcação configurados recentemente. Depois da preparação, as amostras foram observadas no analisador CELLSPOTTER. O analisador foi reconfigurado de tal forma que foram apresentados ao usuário eventos DAPI- positivo nucleado, de citoqueratina FITC-positiva, como candidatos CTC.

No painel A da figura 2, é mostrado um exemplo típico de células MCF-7 recuperadas de 7,5 ml de sangue. A fileira superior mostra um aglomerado de células 3MCF-7 que expressam claramente o receptor IGF-1R, a marca a seguir da imagem do composto indica que o operador classificou a célula como uma CTC e a marca seguinte à imagem mostrando a marcação IGF-1R indicou que o operador classificou esta CTC como uma que expressou o IGF-1R. Todas as células mostradas no painel A expressaram claramente o receptor IGF-1R. No sangue de 16 indivíduos saudáveis inoculados com células MCF-7, 80,6% (SD7.7) das células MCF-7 recuperadas foram classificadas como CTCs que expressaram IGF-1R. No painel B da figura 2, é mostrado um exemplo típico de células T-24 recuperadas dos 7,5 ml de sangue. A expressão de IGF-1R das 4 células T24 era claramente mais turva quando comparada com a marcação IGF-1R das células MCF-7 e o operador classificou apenas as duas células do fundo como CTCs que expressaram o receptor IGF-1R. No sangue de 6 indivíduos saudáveis inoculados com células T-24, 13,6% (SD3.9) das células MCF-7 recuperadas foram classificadas como CTCs que expressaram IGF-1R. No sangue de 6 indivíduos saudáveis inoculados com as células PC3-9, 3,8% (SD6.0) das células MCF-7 recuperadas foram classificadas como CTCs que expressaram IGF-1R.

Estes dados forneceram orientação para a densidade do antígeno IGF-1R nas CTCs de pacientes com carcinomas metastáticos, que são requeridos para que ela seja detectada por este ensaio.

Expressão IGF-1R em CTCs em carcinomas metastáticos: Em 7,5 ml de sangue de 139 indivíduos saudáveis, as CTCs estavam virtualmente ausentes (0 CTCs em 135 e 1

CTC em 4). Para se testar se o IGF-1R na realidade poderia ou não ser detectado nas CTCs em pacientes com carcinomas metastáticos, foram testadas amostras de sangue de 50 pacientes. Em 7,5 ml de sangue foram detectadas CTCs em 11 entre 50 (22%) pacientes. Des-

5 tinham câncer do seio e em 28% onde foram detectadas CTCs, 13 tinham câncer colorretal e em 31% onde foram detectadas CTCs, 3 tinham câncer de próstata e em 33% onde foram detectadas CTCs, 12 tinham câncer dos pulmões e em 8% foram detectadas CTCs e em nenhum dos quatro pacientes com câncer ovariano foram detectadas CTCs. Exemplos de CTCs detectados são mostrados na figura 3. Oito candidatas a CTC são mostrados na figura. Os eventos 1, 4, 5, 7 e 8 foram classificados como CTCs e

10 somente as CTCs nas fileiras 1 e 4 foram classificadas como CTCs que expressavam o IGF-1R. Notar que a marcação potencial de IGF-1R pode ser observada nas CTCs nas fileiras 5 e 7, mas isto não foi considerado suficiente para a classificação como CTCs positivas IGF-1R. A tabela 1 mostra o número de CTCs detectadas nos onze pacientes com CTCs, o número de CTCs que expressou IGF-1R, e a proporção de CTCs que expressou IGF-1R. Em 8

15 dos 11 (91%) pacientes, foram detectadas CTCs que expressaram IGF-1R. A proporção de CTCs que expressaram IGF-1R, no entanto, variou bastante.

Tabela 1

	CTCs	IGF1R(+) CTCs	% IGF-1R(+) CTCs
Seios	180	47	26
	25	11	44
	5	1	20
	4	1	25
Colorretal	6	1	17
	5	0	0
	4	0	0
	2	0	0
	1	1	100
Próstata	16	1	6
Pulmão	2	1	50

Exemplo 2

Expressão IGF-1R nas CTCs no estudo de definição de dose da fase 1 de anticor-

20 pos anti -IGF-1R

O estudo 1 era um estudo da fase 1 da determinação da dose projetado para definir a segurança e a tolerância de um anticorpo anti-IGF-1R totalmente humano conforme descrito na patente americana de número 7.037.498 em pacientes com tumores sólidos avan-

çados. Neste estudo, o tratamento com anticorpo anti-IGF-1R foi administrado a cada 21 dias (ciclo de 21 dias) em doses de 3 a 20 mg/kg. Para se avaliar o efeito do tratamento com o anticorpo anti-IGF-1R no número de CTCs e de CTCs de expressão de IGF-1R nestes pacientes, foram obtidas amostras de sangue para a pesquisa no dia 1 da pré-dosagem e no dia 8 do estudo de cada ciclo de tratamento de 21 dias. Uma amostra adicional foi obtida sempre que um paciente foi retirado do estudo devido a progressão da doença. 26 pacientes forneceram amostras de sangue para a contagem das CTCs durante o curso do estudo.

Dezesseis dos 26 pacientes (61%) tinham uma ou mais CTCs em algum ponto durante o estudo (na pré-dosagem ou durante o tratamento). Em 3 dos 16 pacientes com CTCs detectadas em algum ponto durante o estudo, não foi detectada nenhuma CTC com IGF-1R-positivo. Em dois casos foi detectada somente uma CTC em 7,5 ml de sangue. Os níveis de CTCs e de CTCs com IGF-1R-positivo foram registrados em relação ao tempo e foram observados vários padrões de resposta ao tratamento de anticorpos anti-IGF-1R. Quatro exemplos são apresentados na figura 4. No painel A, é mostrada a contagem de CTCs de um paciente tratado com uma só dose de 6 mg/kg de anticorpo anti-IGF-1R. Neste paciente, o número de CTCs e de CTCs de IGF-1R-positivo foi reduzido no dia 8 do tratamento com o anticorpo anti-IGF-1R e não eram mais detectáveis no dia 15 até reaparecerem antes do início do ciclo 2. No painel B, é mostrada a contagem de CTCs de um paciente tratado com uma só dose de 10 mg/kg do anticorpo anti-IGF-1R. Depois de uma ligeira redução de CTCs depois de 8 e 15 dias de tratamento, o número de CTCs e de CTCs de IGF-1R-positivo aumentou no momento em que o paciente foi retirado do estudo. Este paciente apresentou uma progressão da doença através da varredura CT. No painel C, é mostrada a contagem de CTCs de um paciente tratado com uma só dose de 20 mg/kg de anticorpo anti-IGF-1R. Os números de CTCs e de IGF-1R-positivo não foram afetados, exceto para uma inoculação de CTCs 15 dias após a administração da dose. O painel D mostra a contagem de CTCs de um paciente tratado com uma só dose de 3 mg/kg de anticorpo anti-IGF-1R no qual quase todas as CTCs detectadas expressaram IGF-1R. Foi notado um aumento de CTCs no momento em que o paciente foi retirado do estudo. Uma interpretação possível destes dados é que a maior parte das células circulantes de tumor nestes pacientes expressou IGF-1R e que o tratamento com anticorpos anti-IGF-1R parece bloquear um sinal de sobrevivência necessário para a preservação das CTCs. Alternativamente, o efeito do anticorpo anti-IGF-1R poderá acontecer diretamente na massa de tumor, inibindo a migração de CTCs.

A despeito da variabilidade, foi observada uma redução no número de CTCs e de CTCs de IGF-1R-positivo após a dosagem, assim como uma repercussão no número de células circulantes no final do ciclo de tratamento. Foram também notados aumentos nos números de CTCs e de CTCs de IGF-1R-positivo em visitas de averiguação após o estudo.

Estes dados confirmam a função dos ensaios de CTC e de CTC-IGF-1R na monitoração da resposta biológica e clínica aos anticorpos anti-IGF-1R.

Exemplo 3

Expressão IGF-1R em CTCs no estudo de anticorpos anti -IGF-1R em combinação com Docetaxel

O estudo 2 foi um estudo de determinação da dose da fase 1b de um anticorpo anti-IGF-1R totalmente humano conforme descrito na patente americana de número 7.037.498 em combinação com docetaxel (TAXOTERE) em pacientes com tumores sólidos avançados. O docetaxel e o anticorpo anti-IGF-1R foram administrados nos dias 1 e no dia 22 em doses de 75 mg/m² e 0,1 - 10 mg/kg, respectivamente. Vinte e sete pacientes forneceram amostras de sangue para a contagem de CTCs, incluindo 19 pacientes com câncer de próstata refratário a hormônio (HRPC). As amostras de CTCs foram recolhidas em cada ciclo no dia 1 antes das dose e no dia 8.

Dezenove dos 27 pacientes (70%) tinham uma ou mais CTCs em algum ponto durante o estudo. Somente em um dos 19 pacientes com CTCs detectados em algum ponto do estudo, não foi detectada nenhuma CTC de IGF-1R- positivo. Interessantemente, em todas as cinco avaliações de CTCs deste paciente, foram detectadas CTCs e não foram detectadas CTCs de IGF-1R-positivo, sugerindo que o próprio local do tumor nestes pacientes poderá não expressar IGF-1R.

Foram observadas reduções no número de CTCs em resposta ao tratamento na maioria dos pacientes. Os níveis de CTCs e de CTCs com IGF-1R-positivo foram registrados em relação ao tempo e foram observados vários padrões de resposta ao tratamento com anticorpos anti-IGF-1R. Quatro exemplos são detalhados na figura 5. O painel A detalha o número de CTCs e de CTCs com IGF-1R-positivo em um paciente com câncer de próstata refratário a hormônio tratado com 10 mg/kg de anticorpo anti-IGF-1R e 75 mg/m² de docetaxel (ciclo de 21 dias). Após o tratamento, o número total de CTCs foi reduzido refletindo uma resposta ao tratamento combinado. Os valores de PSA obtidos deste paciente confirmaram uma resposta clínica ao tratamento. Além disso, neste paciente, aproximadamente 50% das CTCs eram originalmente de IGF-1R-positivo antes da terapia de anticorpo anti-IGF-1R/docetaxel; o número de CTCs de IGF-1R-positivo foi reduzido rapidamente com o tratamento. Como o efeito biológico do anticorpo anti-IGF-1R é induzir uma regulação para baixo de IGF-1R, estes dados confirmam as funções potenciais dos ensaios de CTC de CTC-IGF-1R na monitoração, tanto da atividade clínica como da biológica (biomarcador) dos anticorpos anti -IGF-1R. O painel B detalha um paciente com uma redução semelhante no número de CTCs e de CTCs com IGF-1R- positivo. Os painéis C e D detalham dois pacientes nos quais o número de CTCs e de CTCs com IGF-1R-positivo foi reduzido após a administração de cada dose, mas também foram repartidos cada vez. Ambos os pacientes foram

tratados com doses baixas de anticorpo anti-IGF-1R (0,8 e 3 mg/kg, respectivamente).

Os pacientes HRPC envolvidos no estudo 2 que tinham pelo menos uma CTC de IGF-1R-positivo detectado tinham níveis mais elevados de PSA (n= 10, PSA médio de 475 ng/ ml) do que aqueles que eram IGF-1R-CTC negativo (n=8, PSA médio de 92 ng/ml). Não foi possível nenhuma avaliação em dois pacientes, devido à ausência de amostras. Apesar do problema aparente de alto desenvolvimento do tumor, os pacientes que eram IGF-1R-CTC positivo na pesquisa responderam através de critérios PSA em uma proporção maior (6 entre 10), e de um modo geral, mais cedo do que a combinação de docetaxel e anticorpo anti-IGF-1R do que aqueles que eram IGF-1R-CTC negativos (2 de 8), conforme mostrado na tabela 2:

Tabela 2

Pacientes HRPC que responderam ao tratamento	Linha básica de PSA (ng/mL)	Linha básica de CTCs	Linha básica de IGF-1R (+) CTCs	Ciclo de tratamento da resposta inicial de PSA
1006	238	2	1	3º
1008	471	4	1	12º
1014	9944	12	5	2º
1019	617	44	19	3º
1022	1639	6	2	1º
1025	807	160	37	1º
1003	13	0	0	6
1011	131	0	0	12

Dos 8 pacientes HRPC que não tinham nenhuma CTC detectável no início do estudo, 6 não responderam ao tratamento, e 3 dos mesmos na realidade apresentaram um aumento da contagem de CTCs e de CTC de IGF-1R- positivo no momento da progressão da doença. Finalmente, o único paciente HRPC tratado com docetaxel e anticorpos anti-IGF-1R com CTCs detectáveis, mas nenhuma CTC de IGF-1R-positivo, não respondeu ao tratamento combinado. A redução nesta contagem de CTCs foi também de curta duração (1 ciclo).

Na tabela 3, é mostrado um resumo das melhores respostas dos pacientes para os pacientes HRPC no estudo 2. Dois entre 8 (25%) dos pacientes sem nenhuma CTC de IGF-1R- positivo detectável em 7,5 ml antes da iniciação da terapia mostraram uma resposta parcial à terapia, enquanto que 6 de 11 pacientes (55%) com ≥ 1 CTCs de IGF-1R-positivo em 7,5 ml mostraram uma resposta parcial. Estes dados confirmam fortemente a noção de que o ensaio CTC-IGF-1R poderia ser utilizado para a identificação de pacientes que poderiam ser beneficiados com a terapia de anticorpos anti -IGF-1R, assim como para identificar

a dose ótima e determinar a duração do tratamento.

Tabela 3

Células circulantes de tumor com IGF-1R-positivo e a melhor resposta dos pacientes no estudo 2

5	PacienteIGF-1R(+) CTCs Melhor resposta		
	Na linha básica(n)		
	1001	2	PD
	1005	2	SD
	1006	1	PR
10	1008	1	PR
	1012	31	PD
	1013	4	PD
	1014	5	PR
	1019	19	PR
15	1021	4	PD
	1022	2	PR
	1025	37	PR
	total=6 PR/11 pacientes		
	PacienteIGF-1R(+) CTCs Melhor resposta		
20	na linha básica(n)		
	1002	0	SD
	1003	0	PR
	1010	0	PD
	1011	0	PR
25	1015	0	SD
	1016	0	PD
	1018	0	SD
	1020	0	SD

total=2 PR/8 pacientes

30 PD = doença progressiva; SD=doença estável; PR-resposta parcial

Exemplo 4

Expressão de IGF-1R em CTCs no estudo de anticorpos anti- IGF-1R em combinação com Paclitaxel e Carboplatin

35 O estudo 3 foi um estudo da fase 1b de um anticorpo anti-IGF-1R totalmente humano no conforme descrito na patente americana de número 7.037.498 em combinação com paclitaxel (TAXOL) e carboplatin (PARAPLATIN) em pacientes com tumores sólidos avançados. As doses de paclitaxel, carboplatin e anticorpo anti-IGF-1R eram de 200 mg/m² , AUC

de 6, e 0,05 - 10 mg/kg, respectivamente. Quarenta e um dos pacientes forneceram amostras de sangue para a contagem de CTCs. As amostras de sangue foram recolhidas em cada ciclo no dia 1 antes da dose e no dia 8.

Vinte e um dos 41 pacientes (51%) tinham uma ou mais CTCs em algum ponto durante o estudo, enquanto que 10 dos 41 pacientes (24%) tinham uma ou mais CTCs antes da primeira dose ser administrada. Dezesesseis dos 41 pacientes (39%) tinham uma ou mais CTCs de IGF-1R-positivo em algum ponto durante o estudo, enquanto que 8 dos 41 pacientes (20%) tinham 11 ou mais CTCs de IGF-1R-positivo antes da primeira dose ser administrada. Um paciente HRPC envolvido no estudo tinha um grande número de CTCs no início do estudo (71 CTCs e 15 CTCs com IGF-1R-positivo) que foram reduzidos em resposta ao tratamento (21 CTCs e 2 CTCs com IGF-1R pelo tratamento no dia 21).

Os níveis de CTCs e de CTCs com IGF-1R-positivo foram registrados em relação ao tempo e foram observados vários padrões de resposta ao tratamento. Quatro exemplos são detalhados na figura 6. O painel A representa dados de um paciente que foi incluído no estudo com um número muito pequeno de CTCs. Depois de seis ciclos de tratamento com paclitaxel /carboplatin e 0,05 mg/kg do anticorpo anti-IGF-1R seguido por dois ciclos adicionais de 3 mg/kg de anticorpo anti-IGF-1R, o paciente não respondeu mais à terapia. Esta falta de resposta clínica foi associada com um aumento dramático no número de CTCs e de CTCs com IGF-1R-positivo. A progressão da doença neste paciente foi confirmada através de varredura CT. Os dados do painel B são apresentados de um paciente com um padrão semelhante de elevação de CTCs e de CTCs com IGF-1R-positivo durante o curso do estudo. Nos painéis C e D são ilustrados dois pacientes com CTCs antes do início da terapia. Os pacientes receberam 1,5 e 6 mg/kg de anticorpo anti-IGF-1R, respectivamente. O número de células positivas de IGF-1R pareceu ser reduzido (painel C) ou permaneceu baixo (painel D) enquanto o paciente estava sendo tratado com o anti-IGF-1R. Estes dados confirmam ainda mais uma função potencial dos ensaios de CTCs e de CTCs-IGF-1R na monitoração do efeito do desenvolvimento de resistência aos tratamentos com anticorpos anti-IGF-1R.

Apesar de terem sido prescritas aqui certas realizações atualmente preferidas da invenção, ficará rapidamente aparente para aqueles adestrados na arte, aos quais a invenção pertence, que poderão ser feitas variações e modificações das realizações descritas sem se afastarem do espírito e do escopo da invenção. Assim sendo, pretende-se que a invenção seja limitada somente até o ponto requerido pelas reivindicações anexas e pelas regras aplicáveis da lei.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prever a eficácia da terapia antagonista de IGF-1R em um paciente, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender as etapas de:

a) obtenção de um espécime biológico do paciente;

5 b) preparação de uma amostra onde o espécime biológico é misturado com um ligante que reage especificamente com as células de tumor, para a exclusão substancial de outros componentes da amostra;

c) contato da amostra com pelo menos um reagente que se liga especificamente a células epiteliais;

10 d) contato da amostra com um agente tendo uma afinidade de ligação para receptores de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) nas células; e

e) análise da amostra para a determinação da presença de células de tumor expressando IGF-1R,

15 onde o ligante é um anticorpo que se liga especificamente a uma molécula de adesão da célula epitelial na célula de tumor, onde o reagente é um anticorpo marcado com FITC que reconhece citoqueratinas, onde o agente é um anticorpo marcado com PE, e onde a presença de células de tumor expressando IGF-1R na amostra é preditiva da eficácia da terapia antagonista de IGF-1R no paciente.

20 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender ainda a etapa de determinação do número de células de tumor que expressam IGF-1R.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender ainda a etapa de adição à amostra um corante específico de célula para permitir a exclusão de células não nucleadas residuais e de fragmentos de células da análise.

25 4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, **CARACTERIZADO** pelo fato das células de tumor marcadas serem analisadas por pelo menos um processo selecionado do grupo consistindo de citometria de fluxo de parâmetros múltiplos, microscopia de imunofluorescência, citometria de varredura a laser, análise de imagem com base em campo brilhante, volumetria capilar, análise de imagem de espectro, 30 análise manual de célula, análise CELLSPOTTER, e análise automatizada de célula.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, **CARACTERIZADO** pelo fato da amostra ser uma amostra imunomagnética compreendendo o espécime biológico misturado com partículas magnéticas acopladas ao ligante, e compreendendo ainda a etapa de submissão da amostra imunomagnética a um campo magnético, 35 de tal forma que a amostra imunomagnética se torne uma suspensão enriquecida de células de tumor.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato das par-

tículas magnéticas serem coloidais.

7. Método para a monitoração da eficácia de uma terapia antagonista de IGF-1R em um paciente, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender as etapas de:

- a) obtenção de um primeiro espécime biológico do paciente;
- 5 b) preparação de uma primeira amostra, onde o primeiro espécime biológico é misturado com um ligante que reage especificamente com células de tumor, para a exclusão substancial de outros componentes da amostra;
- c) contato da primeira amostra com pelo menos um reagente que se liga especificamente a células epiteliais;
- 10 d) contato da primeira amostra com um agente tendo afinidade de ligação para receptores de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) nas células;
- e) análise da primeira amostra para a determinação da presença e do número de células de tumor expressando IGF-1R;
- f) administração ao paciente de uma terapia antagonista de IGF-1R;
- 15 g) depois da administração da terapia antagonista de IGF-1R, obtenção de um segundo espécime biológico do paciente;
- h) preparação de uma segunda amostra do segundo espécime biológico, onde o segundo espécime biológico é misturado com o ligante que reage especificamente com células de tumor, e execução das etapas c) - e) na segunda amostra; e
- 20 i) comparação do número de células de tumor expressando IGF-1R na primeira amostra com o número de células de tumor expressando IGF-1R na segunda amostra, com um número menor na segunda amostra sendo indicativo da eficácia da terapia antagonista de IGF-1R no paciente, onde o ligante é um anticorpo que se liga especificamente a uma molécula de adesão de célula epitelial na célula de tumor, onde o reagente é um anticorpo marcado com FITC que reconhece citoqueratinas, e onde o agente é um anticorpo
- 25 marcado com PE.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células de tumor marcadas são analisadas por pelo menos um processo selecionado do grupo consistindo de citometria de fluxo de parâmetros múltiplos, microscopia de imunofluorescência, citometria de varredura a laser, análise de imagem com base em campo brilhante, volumetria capilar, análise de imagem de espectro, análise manual de célula, análise CELLSPOTTER, e análise automatizada de célula.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato da amostra ser uma amostra imunomagnética compreendendo o espécime biológico misturado com partículas magnéticas acopladas ao ligante, e compreendendo ainda a etapa de submissão da amostra imunomagnética a um campo magnético, de tal forma que a amostra imunomagnética se torne uma suspensão enriquecida de células de tumor.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CHARACTERIZADO** pelo fato das partículas magnéticas serem coloidais.

11. Método, de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, **CHARACTERIZADO** pelo fato da terapia antagonista de IGF-1R compreender um anticorpo anti IGF-1R.

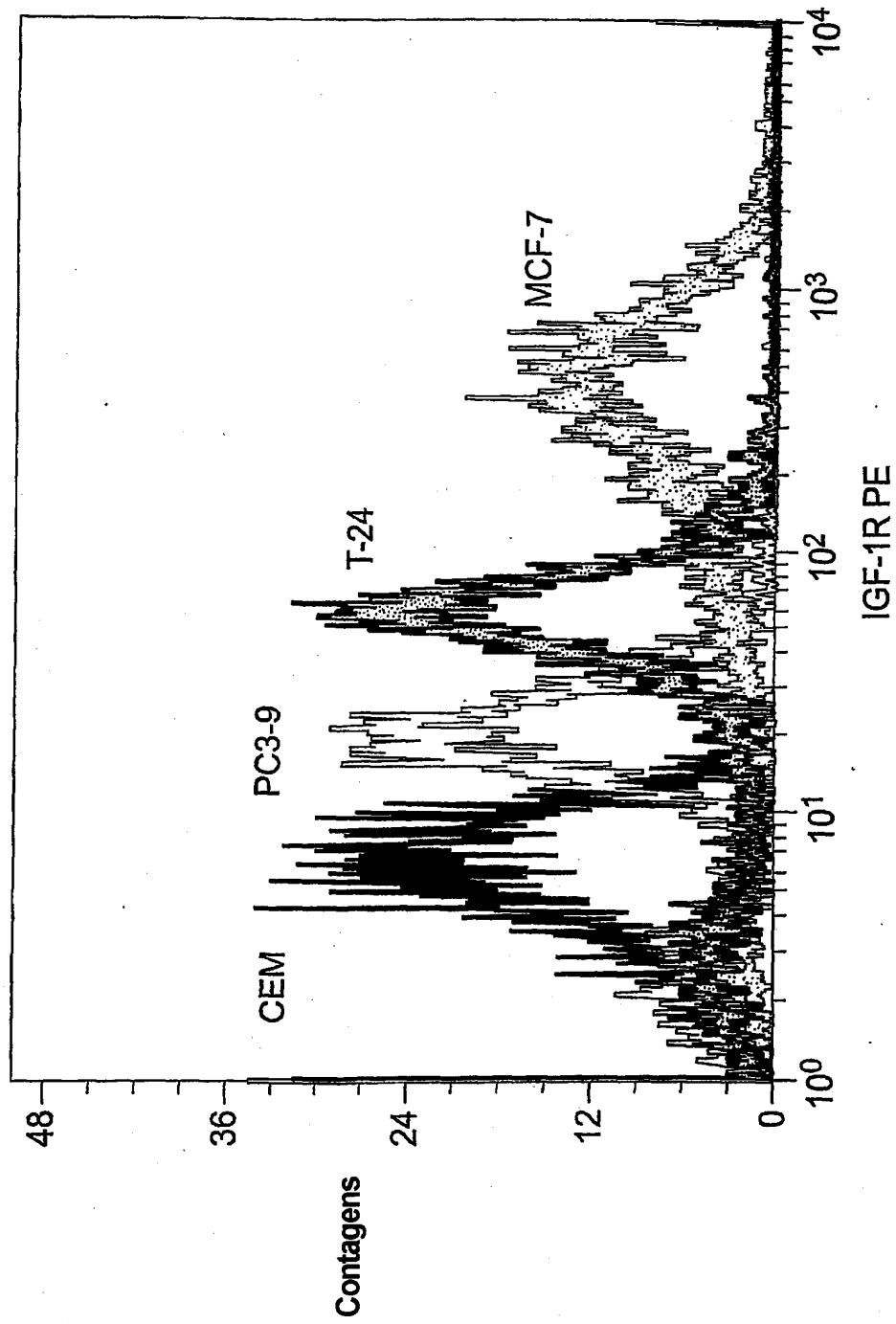
FIG. 1

FIG. 2

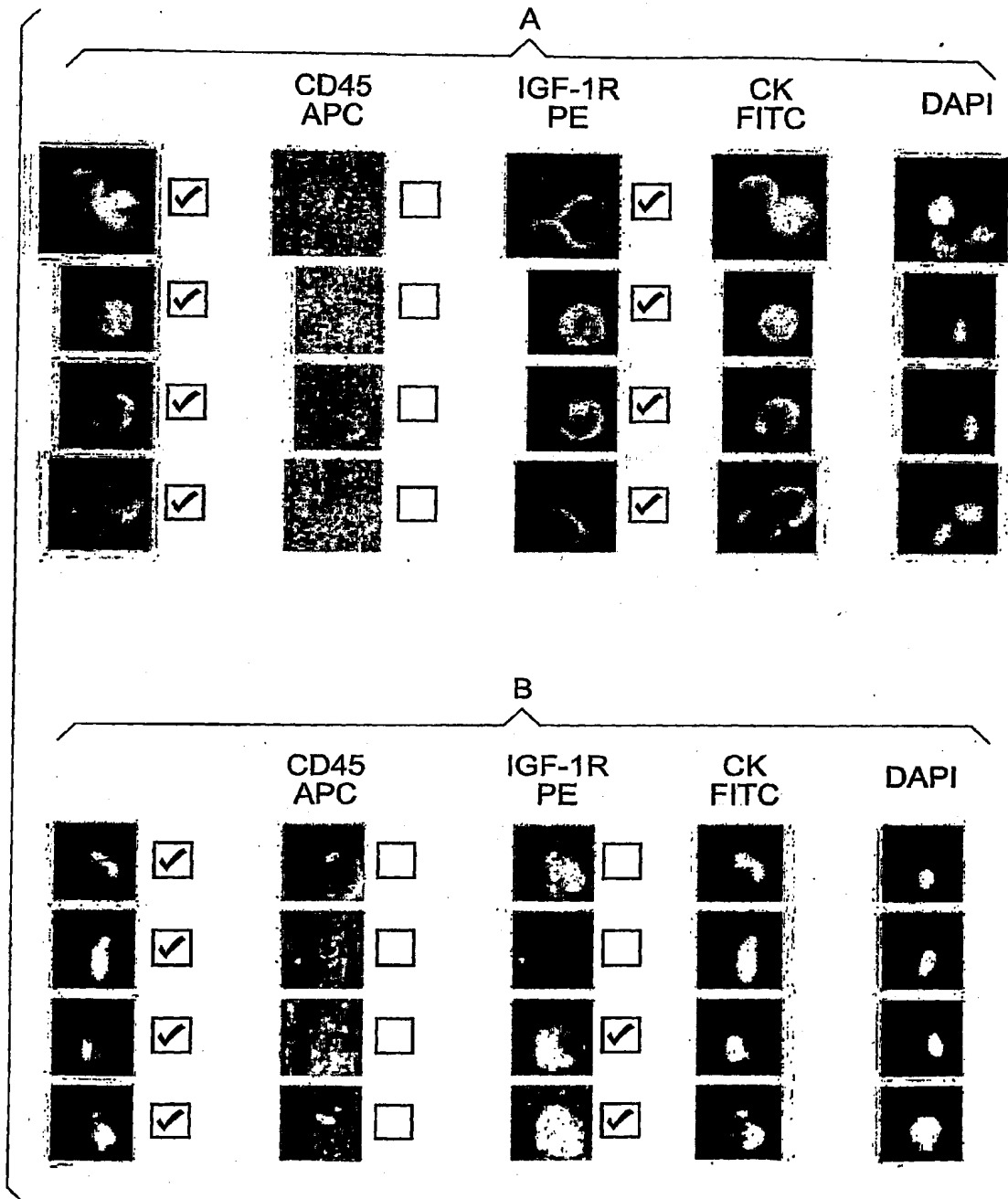


FIG. 3

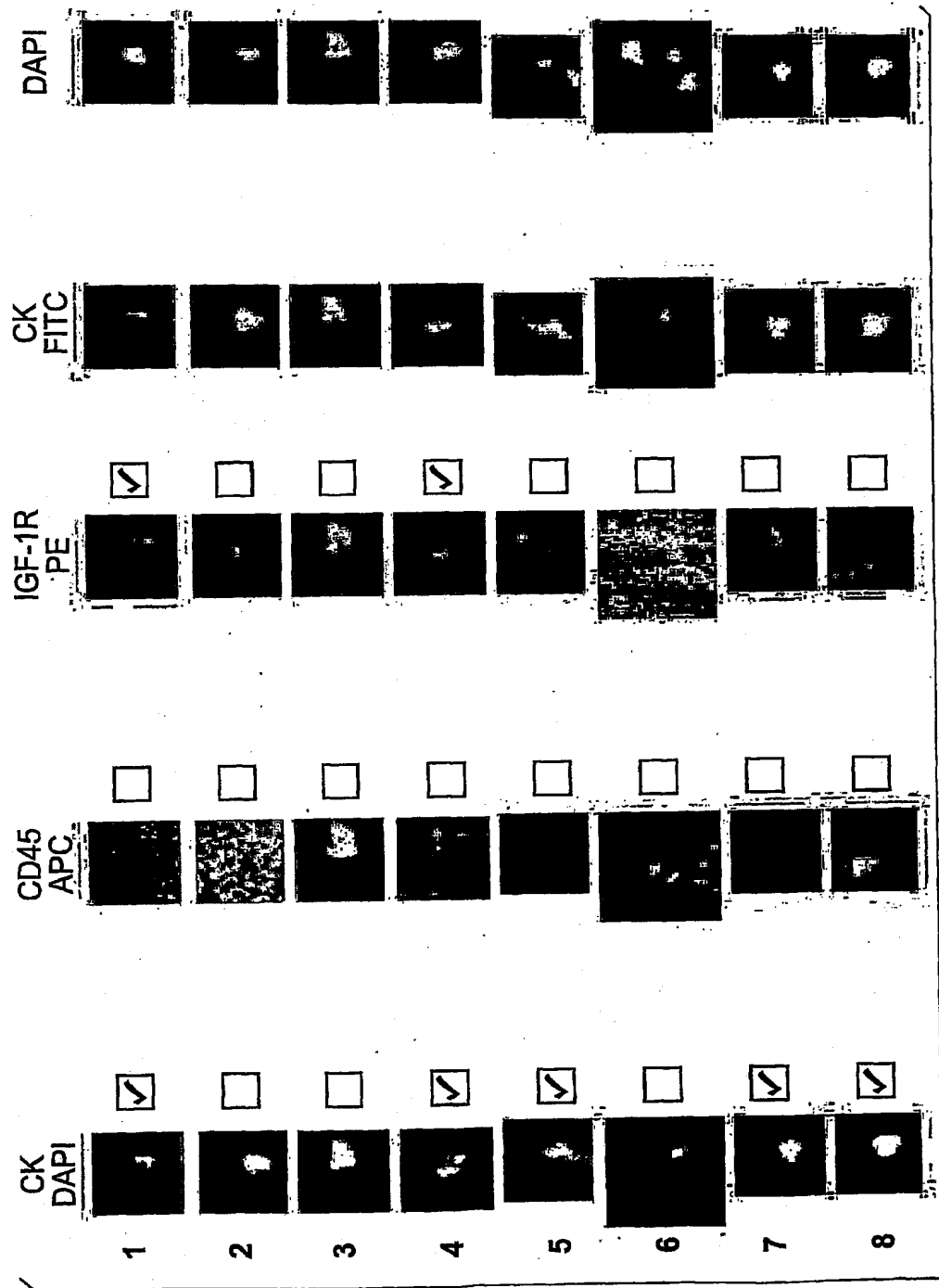


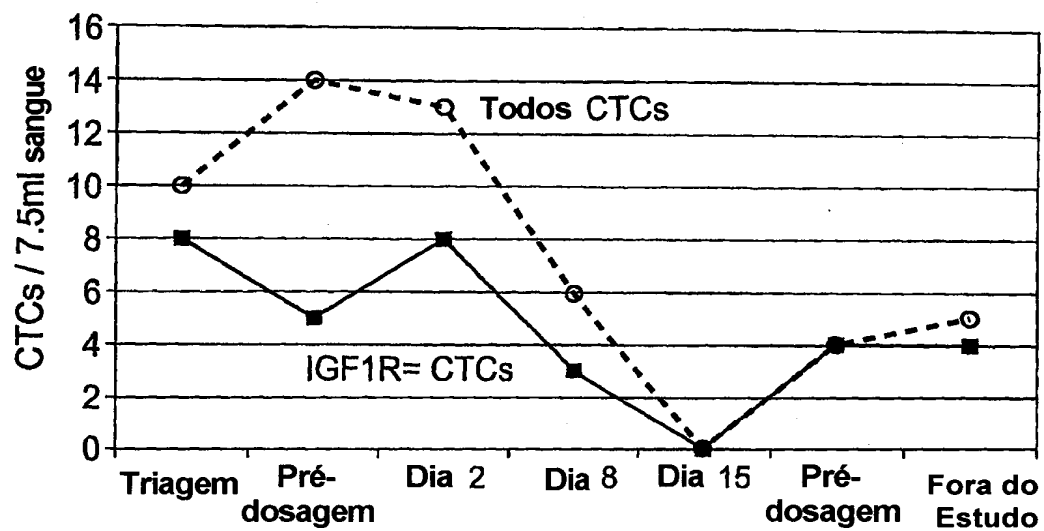
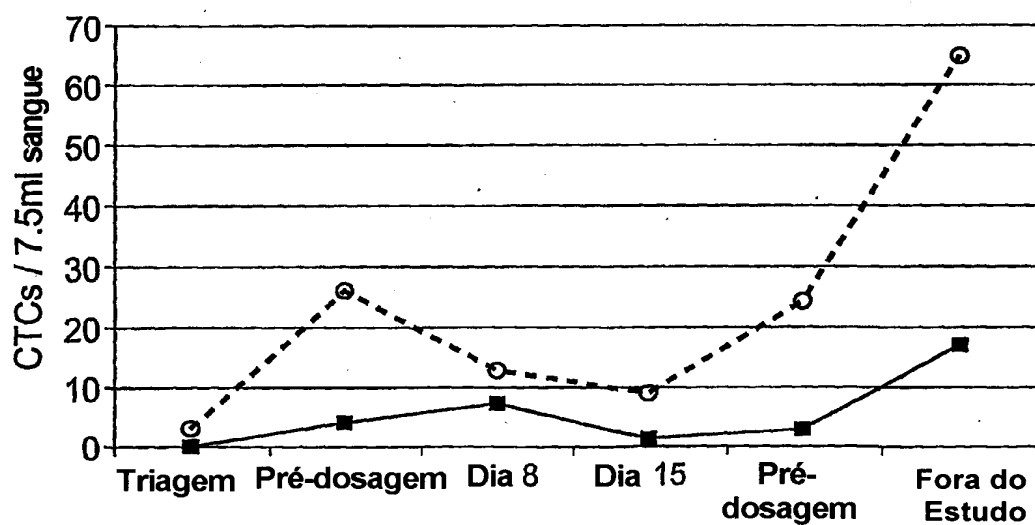
FIG. 4A**FIG. 4B**

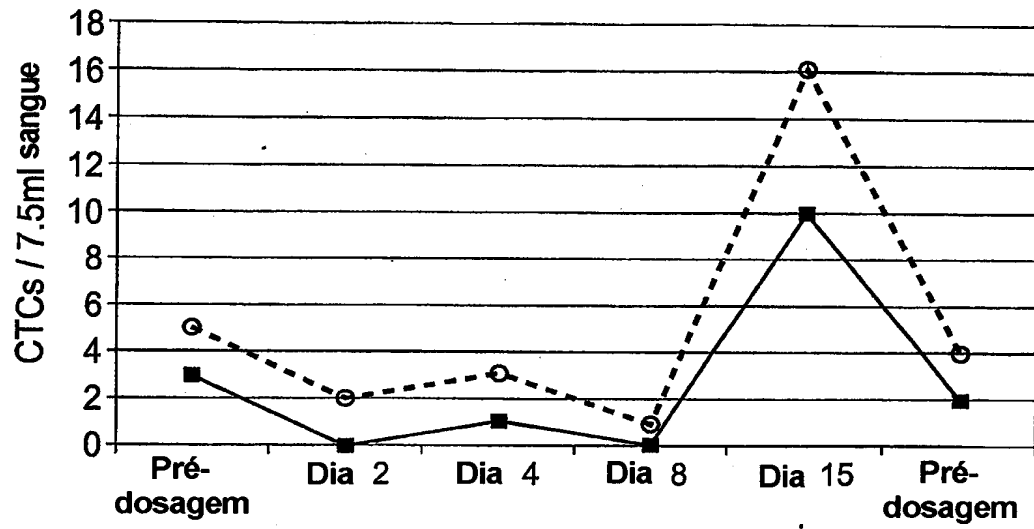
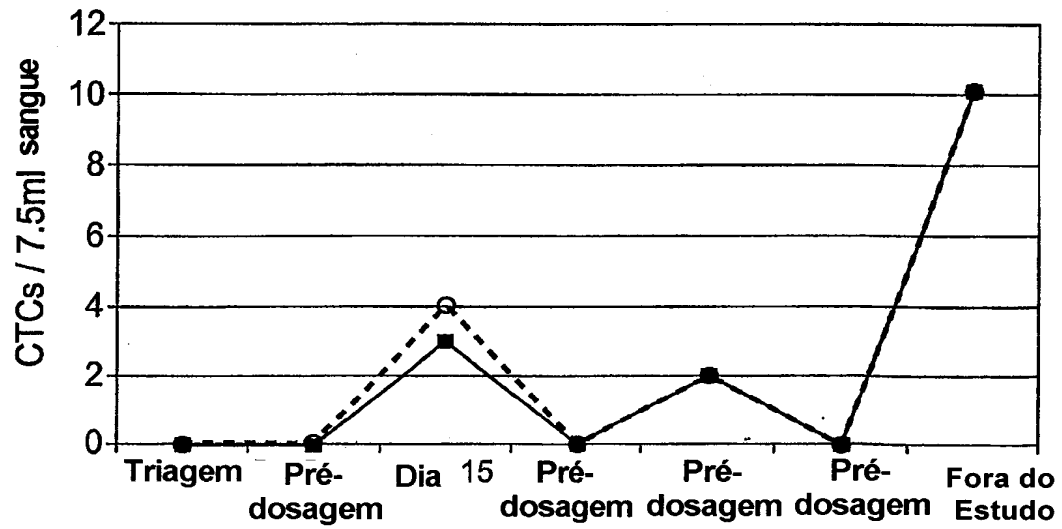
FIG. 4C**FIG. 4D**

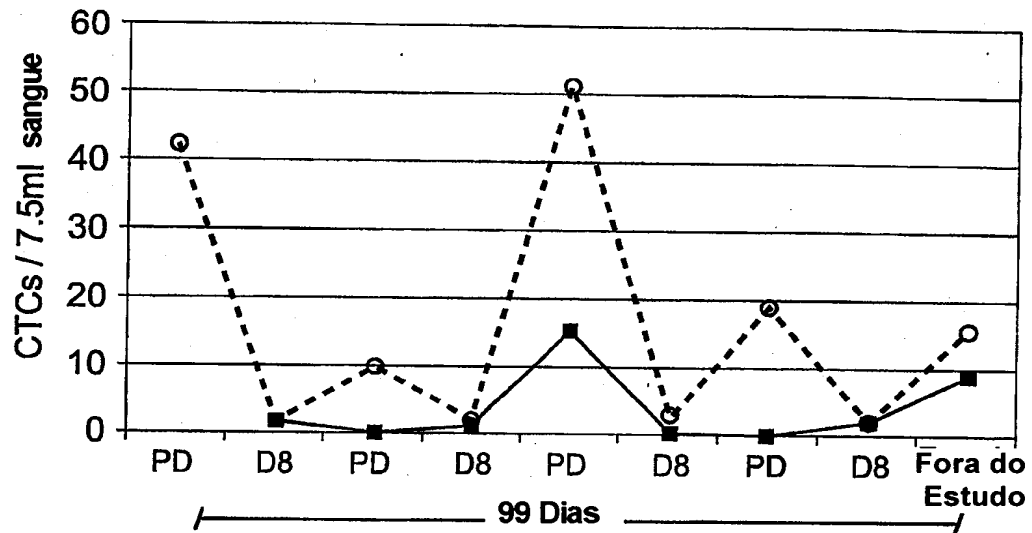
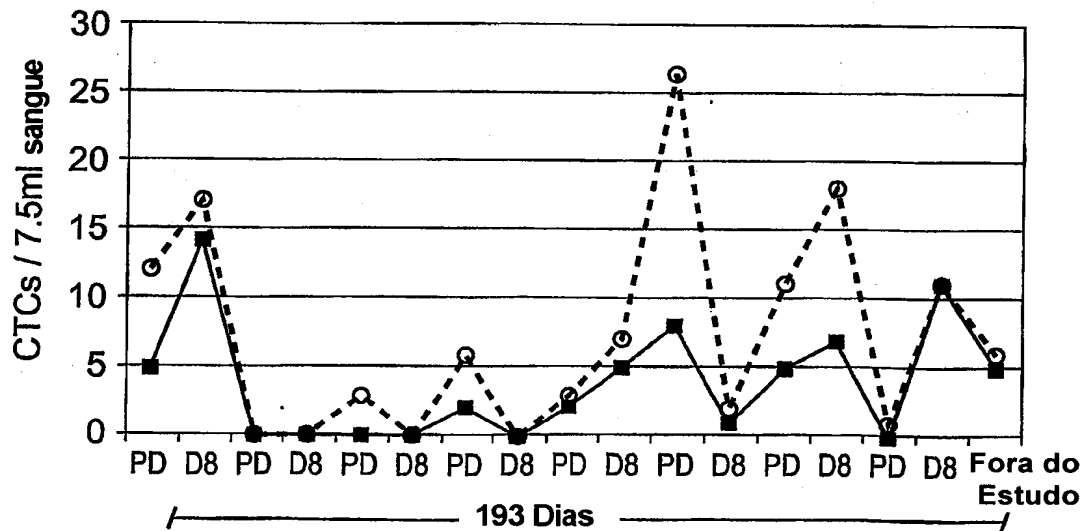
FIG. 5C**FIG. 5D**

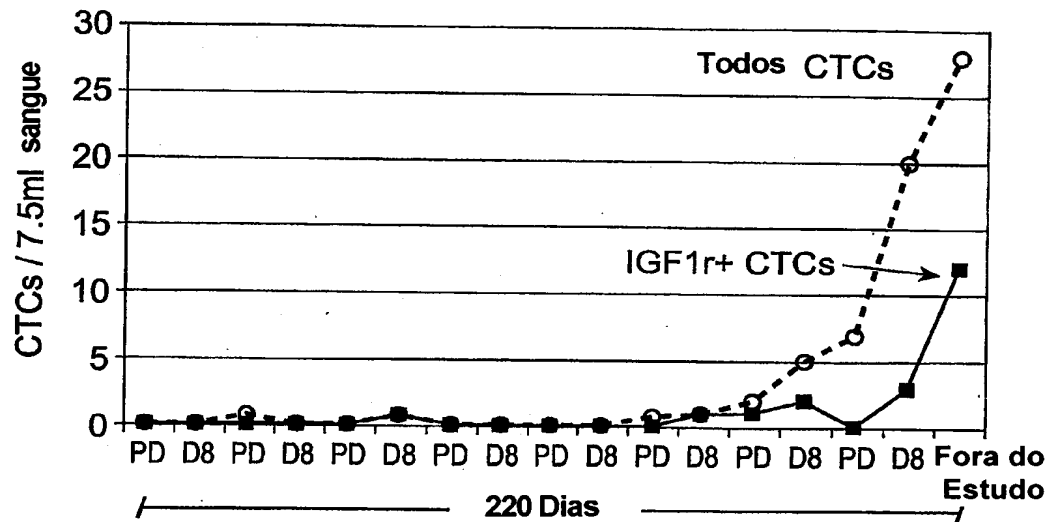
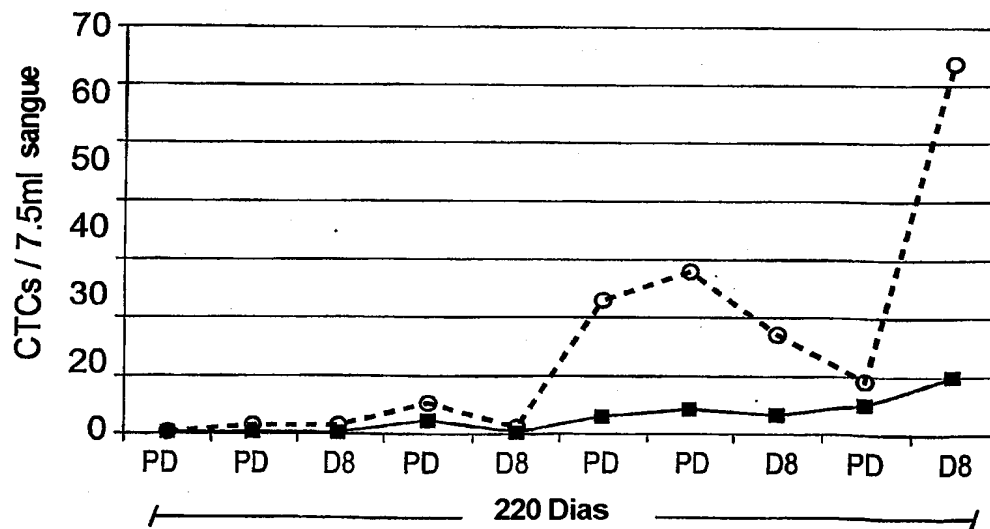
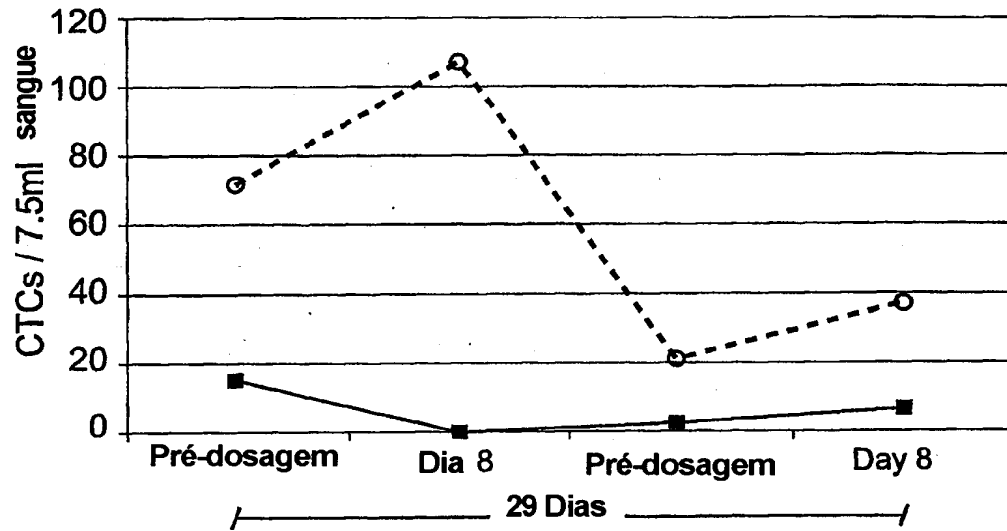
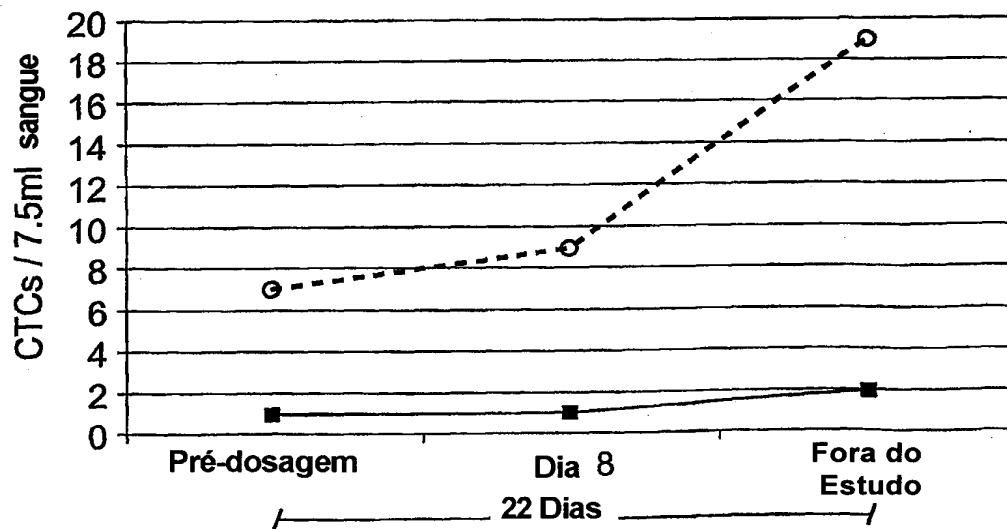
FIG. 6A**FIG. 6B**

FIG. 6C**FIG. 6D**

RESUMO

“MÉTODOS PARA PREVER E MONITORAR A EFICÁCIA DA TERAPIA ANTAGONISTA DE IGF-1R”

5 São apresentados métodos para a detecção, contagem e análise de células circulantes de tumor que expressam receptores de fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R). Estes métodos são úteis para a pesquisa de câncer e o estadiamento, desenvolvimento de regimes de tratamento, e para a monitoração de respostas ao tratamento, recorrência de câncer ou semelhante. São também apresentados conjuntos de teste que facilitam a detecção, contagem e análise de tais células circulantes de tumor.