



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 342 646**

② Número de solicitud: 200801652

⑤ Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.06.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2010**

Fecha de la concesión: **12.04.2011**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **26.04.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.04.2011

⑰ Titular/es: **Institut de Recerca Hospital Universitari
Vall d'Hebron
Pg. Vall d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona, ES
Fundació Privada Institut d'Investigació
Oncologica de Vall d'Hebron y
Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats**

⑱ Inventor/es: **Angellini, Pier Davide;
Pedersen, Kim;
Arribas López, Joaquín;
Laos, Sirle y
Parra Palau, Josep Lluís**

⑲ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑳ Título: **Método de diagnóstico de cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas.**

㉑ Resumen:

Método de diagnóstico de cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas.

La invención se refiere a un método de diagnóstico y determinación de pronóstico de cánceres del tipo que expresa el receptor HER2 o sus variantes truncadas. El método comprende la detección de la presencia en una muestra de una de las formas truncadas del citado receptor HER2. La invención también proporciona nuevos anticuerpos específicos de esta forma truncada, así como kits que los comprenden.

ES 2 342 646 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas.

5 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2. La invención también propone compuestos de aplicación en el diagnóstico e identificación precoz del cáncer.

Estado de la técnica

10 HER2 (también conocido como c-erbB2, ErbB2 o Neu) es una proteína transmembrana del tipo I que pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico o EGFR (del inglés Epidermal Growth Factor Receptor), también conocido como HER1 o ErbB1. Dos miembros adicionales, HER3 y HER4 completan esta familia. Cuando HER1, 3 ó 4 se unen a un ligando tipo EGF, su dominio extracelular adopta la conformación denominada “abierta”,
15 la cual permite la formación de homodímeros o heterodímeros. Por el contrario, HER2 aunque no se una a ningún ligando, también interacciona con otros receptores HER unidos a ligando, debido a que su dominio extracelular está de manera constitutiva en conformación “abierta”.

20 La dimerización dirigida por el dominio extracelular conduce a la interacción de las quinasas intracelulares de los receptores HER y a la subsiguiente transfosforilación de algunos residuos de tirosina. Estas fosfotirosinas, situadas en el extremo C-terminal de los receptores HER, actúan como acopladores de un grupo de proteínas intracelulares de unión a fosfotirosinas. Las interacciones establecidas en la membrana plasmática son transducidas al núcleo celular por medio de distintas vías de señalización, tales como la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno activada por Ras (MAPK), la vía de la proteína quinasa activada por estrés, la fosfolipasa C gamma, etc. Todos estos circuitos de
25 señalización controlan la expresión de genes que actúan de manera coordinada para modificar aspectos determinantes del estado celular, tales como la proliferación celular, la migración, la supervivencia y la adhesión. Así, dependiendo del contexto celular, la activación de los receptores HER resulta en una respuesta celular dramática que puede ir desde la transformación a célula maligna a una senescencia prematura.

30 Además del modo de señalización canónico, los receptores HER o fragmentos de los mismos pueden ser endocitados y transportados a núcleo, donde directamente pueden regular la expresión de ciertos genes. Este hecho se ha observado para el caso concreto de HER2 (Wang *et al.*, “Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2”, *Cancer Cell-2004*, Vol. 6, pp. 251-261), así como para un fragmento carboxiterminal (CTF, del inglés Carboxy Terminal Fragments), que consiste en una forma truncada del receptor HER4, que incluye el dominio citoplasmático entero (Linggi *et al.*, “ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent
35 transcriptional repression”, *J. Biological Chemistry-2006*, Vol. 281, pp. 25373-25380).

40 En tumores mamarios humanos se han encontrado frecuentemente una serie de fragmentos carboxiterminales o CTFs (del inglés Carboxy Terminal Fragments), que se asume que incluyen los dominios transmembrana y citoplasmático de HER2. (Molina *et al.*, “NH(2)-terminal truncated HER2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer”, *Clinical Cancer Research-2002*, Vol. 8, pp. 347-353). Se conoce además que las pacientes con cáncer de mama que expresan los CTFs de HER2, o, lo que es lo mismo, formas truncadas que no incluyen el extremo N-terminal de HER2 (HER2 CTFs), tienen mayor probabilidad de desarrollar metástasis (Molina *et al.* 2002 - *supra*) y un pronóstico peor que aquellas pacientes que expresan predominantemente la forma completa de HER2 (Saez *et al.*, “p95HER2 predicts worse outcome in patients with HER2-positive breast cancer”,
45 *Clinical Cancer Research-2006*, Vol. 12, pp. 424-431).

Por ello, resulta muy importante poder detectar a tiempo la presencia de HER2 en tumores y más aún poder determinar si está en forma completa o truncada (CTF).

50 Hoy en día, a nivel de clínica rutinaria se emplean anticuerpos para detectar la presencia de la forma completa de HER2, a fin de determinar ante qué tipo de tumor mamario nos encontramos. En el caso de detectarse la presencia de HER2, la terapia recomendada consiste en la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos, tal como el trastuzumab de Genentech. El uso de este anticuerpo monoclonal para el tratamiento del cáncer, aparece descrito en el documento de solicitud de patente WO 8906692 de Genentech. En WO 8906692 se describen anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra la región extracelular de HER2, coincidiendo esta región extracelular con el dominio externo completo de la proteína, que es su extremo N-terminal. Se relaciona una serie de anticuerpos monoclonales con líneas de cáncer de mama concretas. Según se ha indicado anteriormente, los epítomos reconocidos por los anticuerpos citados en WO 8906692 son regiones antigénicas del dominio extracelular de la forma completa
60 de HER2 y no incluyen formas truncadas o fragmentos carboxiterminales de HER2. Por ello, con los anticuerpos y el método de diagnóstico descritos en WO 8906692 no se podrá detectar la presencia de HER2 truncados (CTFs). Además, en tumores mamarios donde dichos CTFs de HER2 se expresan, los anticuerpos como el trastuzumab no resultan terapéuticos, puesto que no reconocen a ningún epítipo. Este hecho explica la resistencia al tratamiento con trastuzumab que se observa en los pacientes que expresan formas truncadas (CTFs) de HER2.

65 Los pacientes que mayoritariamente expresan formas truncadas o CTFs de HER2 deberían ser tratados con terapias alternativas para evitar las cifras de pronóstico pobre observadas por Sáez *et al* 2006 (*supra*). En cualquier caso, con la finalidad de detectar (diagnosticar) y tratar cuanto antes a las personas que tengan tumores en los que se expresan

formas truncadas de HER2, resulta muy interesante poder diferenciar qué tipo de forma de HER2 se expresa para luego actuar en consecuencia.

5 En el documento de Anido *et al.*, “Biosíntesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation”, *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*-2006, Vol. 25, pp. 3234-3244, se describe que, además del fragmento generado por la acción de las alfa-secretasas sobre HER2, que da lugar a una forma truncada CTF conocida como P95, que incluye el fragmento transmembrana y citoplasmático del receptor, también se generan dos formas truncadas CTF, mediante un mecanismo de iniciación alternativa de la traducción a partir de dos metioninas situadas aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, del dominio transmembrana de HER2. Concretamente, las metioninas para iniciación alternativa de la traducción corresponden a la metionina 611 y a la metionina 687 de la secuencia de aminoácidos con el número de acceso M11730.1 de la base de datos UniGene del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Este documento también demuestra que estas formas alternativas del receptor HER2 (CTFs) están presentes en tumores mamarios. Concretamente, se indica que la más abundante corresponde a la forma denominada CTF687, o lo que es lo mismo, a la proteína obtenida por la iniciación alternativa de la traducción a partir de la metionina en posición 687. Anido *et al.* propone como terapia el uso de inhibidores de la actividad tirosinquinasa de HER2, tal como lapatinib, para minimizar el crecimiento de los tumores que expresan estas formas truncadas de HER2. Los inhibidores de la tirosinquinasa actúan interaccionando con el extremo C-terminal del receptor HER2 que está presente de forma íntegra tanto en el receptor completo como en los CTFs derivados del mismo o producidos por iniciación alternativa de la traducción.

20 El documento de Scaltriti *et al.*, “Expresión of p95HER2, a truncated form of the HER2 Receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer”, *Journal of National Cancer Institute*-2007, Vol. 99, pp. 628-368, representa un ejemplo de estudio de metodología alternativa para detectar la presencia de una de las formas truncadas del receptor HER2 y detalla algunas de las posibles causas de la resistencia al tratamiento con trastuzumab (Herceptin). Concretamente, se hace hincapié en la acumulación del fragmento p95HER2 (producto de proteólisis de HER2 por alfa-secretasas) y otras formas truncadas del receptor, las cuales no poseen el dominio extracelular reconocido por el Trastuzumab. Scaltriti propone un método de inmunofluorescencia para detectar el fragmento p95HER2 (producto de proteólisis por alfa-secretasas). Este nuevo método de detección puede realizarse en secciones de tejido embebidas en parafina y fijadas con formalina según los protocolos de rutina clínicos. La nueva metodología deriva de observar que la forma truncada p95HER2, y no la forma entera del receptor, se localiza tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de la célula. Este método propone comparar si existe expresión de p95HER2 mediante tinción del citoplasma detectada con un anticuerpo anti-HER2 que se une al dominio citoplasmático del receptor; y en confirmar estos resultados con los de una detección con un anticuerpo anti-citoqueratina, una proteína cuya distribución ha sido ampliamente utilizada como herramienta para el diagnóstico de tumores. Sin embargo no está claro que este método distinga eficientemente aquellos tumores que expresan la forma completa de HER2 de aquellos que expresen las formas truncadas.

30 Existe la necesidad de localizar nuevas y eficientes dianas diagnósticas y terapéuticas, que correlacionen bien con el tipo de cáncer y permitan tratar a tiempo con terapias eficientes aquellos tumores de peor pronóstico, descartando de entrada aquellas terapias que se ha visto que no resultan eficaces.

35 La presente invención aporta ventajas a los problemas citados anteriormente y supone una solución novedosa en la clasificación precoz del cáncer, especialmente el cáncer de mama.

45 **Explicación de la invención**

Se ha determinado que, sorprendentemente, la detección diferencial de una de las formas truncadas (CTF) de HER2, generada por iniciación alternativa de la traducción, correlaciona muy bien con la predicción del tipo de cáncer que debe ser tratado, facilitando la tarea del facultativo a la hora de prescribir una pauta de tratamiento. Esta forma truncada (CTF) de HER2 ha sido aislada y se ha empleado para el desarrollo de múltiples herramientas para poder detectar su presencia en muestras de tejidos aportándose, de esta forma, un conjunto diagnóstico nuevo y sólido, que además es aplicable a la rutina clínica. Otro objeto de la invención son, precisamente, nuevos anticuerpos que reconocen esta forma truncada o CTF de HER2, que no es reconocida por trastuzumab.

55 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres del tipo que expresa el receptor HER2 y/o sus variantes truncadas, que en esencia se caracteriza porque comprende la detección de la presencia en la citada muestra de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1.

60 Dentro del conjunto de cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas, destaca el cáncer de mama. Otros cánceres en los que también se expresan estas proteínas son el cáncer de pulmón, páncreas, colon, estómago, próstata, cabeza y cuello, piel, riñón, testículo, tiroides, vejiga urinaria, útero, vulva, endometrio, ovario, esófago, boca, glándula salivar, laringe, peritoneo, región nasofaríngea, las trompas de Falopio, Wilms, así como linfomas, sarcomas de Swing, sarcoma synovial, meduloblastomas, trofoblásticos, gliomas, glioblastomas, colangiocarcinomas, colesteatoma, condrosarcoma, endimoma, neurilemmomas, neuromas, rhabdomiosarcomas.

ES 2 342 646 B1

Evidentemente, dicha SEQ ID NO: 1 incluye todas aquellas variantes procedentes de variaciones alélicas entre individuos, las cuáles suponen variaciones en número y tipo, de algunos aminoácidos, tal como dos o tres aminoácidos de más o de menos, o la sustitución de un aminoácido por otro que no modifica la estructura global del receptor.

5 En el método de diagnóstico según la invención la detección de la presencia de la forma truncada del receptor HER2 se lleva a cabo con medios seleccionados independientemente del grupo formado por: detección por migración diferencial en un sistema de fase móvil - fase estacionaria de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1 respecto de la forma completa del citado receptor HER2; y detección por unión con anticuerpos específicos de la forma truncada del receptor HER2 que contiene la SEQ ID NO: 1.

10 Por detección por migración diferencial debe entenderse, en el contexto de la presente invención, toda técnica analítica que permita separar los compuestos a detectar en base a su distinta movilidad en un sistema fase móvil-fase estacionaria determinado, tal como una electroforesis. Dicha movilidad distinta puede venir originada por distinta carga eléctrica en el compuesto, distinto peso molecular o distinta afinidad por otros compuestos.

15 Según otra característica de la invención, la etapa de detección de la presencia en la muestra de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1, comprende la detección, con al menos un anticuerpo, de un epítipo definido por una secuencia incluida en la SEQ ID NO: 2. En una realización particular, el método de diagnóstico según la invención, comprende la detección del epítipo definido por la SEQ ID NO: 3.

20 Por epítipo se entiende en el contexto de la presente invención aquella parte de una macromolécula (o de un antígeno) de naturaleza peptídica, cuya secuencia y/o configuración espacial es reconocida por el sistema inmune (anticuerpos, células T, células B).

25 Otro objeto de la invención es un péptido aislado que consiste en la SEQ ID NO: 3.

Es también objeto de la invención un anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce un epítipo de la forma truncada del receptor HER2, dicho epítipo definido por una secuencia de aminoácidos incluida en la SEQ ID NO: 2.

30 El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención, reconoce un epítipo definido por la SEQ ID NO: 3.

El anticuerpo o fragmento del mismo según la invención es un anticuerpo policlonal.

35 En el sentido de la presente invención debe entenderse por “anticuerpo policlonal” al conjunto de anticuerpos producidos por distintas líneas de células B (linfocitos B). Los anticuerpos policlonales son mezclas de inmunoglobulinas secretadas contra un antígeno (macromolécula), cada una de estas inmunoglobulinas capaz de reconocer un epítipo diferente, por proceder de una célula B diferente. Así, dentro de las distintas poblaciones de inmunoglobulinas contenidas en un anticuerpo policlonal existe un tipo de inmunoglobulina que reconoce el epítipo o epítipos de interés de un determinado antígeno.

40 Según otra característica de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo monoclonal está producido, preferentemente, por la línea celular hibridoma con número de acceso DSM ACC2904, depositada en la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ)” de acuerdo con el Tratado de Budapest en fecha 9 de Abril de 2008.

45 Según otra característica de la invención, los fragmentos del anticuerpo se seleccionan del grupo formado por F(ab), F(ab') y Fv. En el contexto de la presente invención, un fragmento de un anticuerpo significa una parte del mismo, que es de un tamaño suficiente y conformación adecuada para unirse a un epítipo presente en la forma truncada del receptor HER2 y así permitir su detección en una muestra.

Otro objeto de la presente invención es una línea celular hibridoma con número de acceso DSM ACC2904, depositada en la “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ)”.

55 Es también objeto de la invención un método de obtención de un anticuerpo monoclonal, donde se cultiva la línea celular hibridoma según la reivindicación 11 en un medio de cultivo apropiado y se recupera el anticuerpo monoclonal de este medio.

60 Es también objeto de la invención el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo según se han descrito anteriormente para el diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2.

65 Es también objeto de la presente invención un agente de diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2 y/o fragmentos C-terminales, que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo según se ha descrito anteriormente.

El agente diagnóstico según la invención, se caracteriza porque el anticuerpo o fragmento del mismo está dispuesto en un soporte sólido.

ES 2 342 646 B1

Otro objeto de la presente invención es un kit de diagnóstico y de determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2 que comprende medios de detección de la presencia, en la citada muestra, de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1. El kit de diagnóstico y determinación de pronóstico, está caracterizado también porque los medios de detección consisten en al menos un agente de diagnóstico según se ha descrito anteriormente.

Según otra característica de la invención, el kit de diagnóstico y determinación de pronóstico comprende medios de detección que consisten en la detección por migración diferencial de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1, respecto de la forma completa del citado receptor HER2.

Es también objeto de la invención el uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo según se ha detallado anteriormente para la preparación de un medicamento. Concretamente, el medicamento es para el tratamiento o la prevención de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1.

Según otra característica de la invención, el uso de los anticuerpos o fragmentos es para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de cánceres de mama en mamíferos, incluyendo humanos.

Según otra característica de la invención, el uso de los anticuerpos o fragmentos es para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de cánceres seleccionados del grupo constituido por cáncer de pulmón, páncreas, colon, estómago, próstata, cabeza y cuello, piel, riñón, testículo, tiroides, vejiga urinaria, útero, vulva, endometrio, ovario, esófago, boca, glándula salivar, laringe, peritoneo, región nasofaríngea, las trompas de Falopio, Wilms, así como linfomas, sarcomas de Swing, sarcoma synovial, meduloblastomas, trofoblásticos, gliomas, glioblastomas, colangiocarcinomas, colesteatoma, condrosarcoma, endimoma, neurilemmomas, neuromas, rhabdomyosarcomas.

Es también objeto de la invención un anticuerpo o fragmento del mismo, a título de medicamento, que reconoce un epítipo de la forma truncada del receptor HER2, dicho epítipo definido por una secuencia de aminoácidos incluida en la SEQ ID NO: 2. En una realización particular, el epítipo queda definido por la SEQ ID NO: 3.

Es también objeto de la invención un método de tratamiento de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el cuál se administra una cantidad adecuada de al menos un anticuerpo según se ha descrito anteriormente.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica destinada al tratamiento de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1, que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo según se ha descrito anteriormente y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables.

Aunque no se especifique, todos los términos científicos y técnicos utilizados en esta redacción tienen el significado que de ellos deriva un experto de la técnica a la que la invención pertenece. Métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí, pueden ser utilizados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término “comprende” y sus variaciones no excluyen otras características, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Además, debe entenderse que la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de grupos preferidos y particulares descritas más arriba.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Esquema de la secuencia proteica de la forma truncada o CTF-611, comparada con la secuencia del receptor HER2 completo y con la forma truncada conocida como p95 (648-CTF/p95), producto de la proteólisis por alfa-secretasas. El dominio transmembrana está representado como una línea helicoidal. El resto de la molécula está indicado con una caja gris. La secuencia del péptido utilizada para generar anticuerpos mono y policlonales aparece subrayada. Las posiciones con puentes disulfuro intramoleculares también se indican con conexiones entre las cisteínas.

Fig. 2: Electroforesis y Western-blot (transferencia a membrana) de muestras de cáncer de mama. (S) significa fracción soluble y (M) fracción membrana. Para la detección de HER2 completo y de la forma CTF-611 se emplearon anticuerpos dirigidos al dominio citoplasmático de las proteínas. LDH: Lactato deshidrogenada (utilizado como control).

Fig. 3: Corresponde a gráficos que muestran los resultados de la evaluación del número de tumores desarrollados en ratones transgénicos que expresan la forma truncada CTF-611 (Fig. 3A) en comparación con ratones transgénicos expresores del receptor HER2 completo; y los resultados del volumen de los tumores detectados (Fig. 3B). En el eje de la Y, N y V significan, respectivamente, Número de tumores y Volumen de los mismos. En el eje de las X, T, significa tiempo en semanas.

Fig. 4: La Fig. 4A muestra una electroforesis y Western-Blot (transferencia a membrana) revelado con un anticuerpo (CB11) que reconoce el dominio citoplasmático del receptor HER2 (dominio común en todas las formas completa y truncadas) o bien con anticuerpos policlonales generados contra el péptido de SEQ ID NO: 3 (α -611-A y α -611-B). Los carriles corresponden a extractos de lisados celulares de células MCF7 (previamente transformadas con las construcciones de la Fig. 1) que expresan la forma completa del receptor HER2, la forma truncada CTF-611 y la forma truncada p95. La Fig. 4B muestra el resultado de un ensayo de inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-A, α -611-B y CB11 practicada en muestras que contenían tanto el receptor HER2 completo, como las formas truncadas CTF-611 y p95.

Fig. 5: La Fig. 5A muestra una electroforesis y Western-Blot (transferencia a membrana) revelado con un anticuerpo (CB11) que reconoce el dominio citoplasmático del receptor HER2 (dominio común en todas las formas completa y truncadas) o bien con el sobrenadante del hibridoma DSM ACC2904 generado contra el péptido de SEQ ID NO 3 (α -611-M3-C5). Los carriles corresponden a mezclas de extractos de lisados celulares de células MCF7 (previamente transformadas con las construcciones de la Fig. 1) que expresan la forma completa del receptor HER2, la forma truncada CTF-611 y la forma truncada p95. La Fig. 5B muestra el resultado de un ensayo de inmunoprecipitación con el anticuerpo CB11 y el anticuerpo monoclonal α -611-M3-C5, practicada en muestras que contenían tanto el receptor HER2 completo, como las formas truncadas CTF-611 y p95.

Modos de realización

En base a las figuras aquí aportadas y siempre a modo de ejemplos ilustrativos y no limitativos, se describen a continuación el método de diagnóstico y determinación de pronóstico de cánceres en los que se expresa el receptor HER2 y/o fragmentos carboxiterminales del mismo (variantes truncadas); nuevos péptidos y anticuerpos específicos contra tales péptidos; nuevas líneas celulares; agentes diagnósticos y kits para la detección, todos ellos objetos de la invención.

La detección diferencial de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1, también denominada en esta invención CTF-611, respecto del receptor HER2 entero o completo, implica poder visualizar dos proteínas con pesos moleculares distintos y secuencias diferentes según se desprende de la Fig. 1. La forma truncada con SEQ ID NO: 1 consiste en la proteína resultante de la iniciación alternativa de la traducción por la metionina 611 de la secuencia completa del receptor HER2. Esta forma o CTF comprende pues un nuevo dominio extracelular, un fragmento transmembrana y un dominio citosólico. El fragmento transmembrana y el dominio citosólico son iguales a los de la forma completa del receptor HER2. Otra forma truncada corresponde a la de la Fig. 1 referenciada como p95 o CTF-648. Esta última forma es el producto de la acción de las alfa-secretasas sobre el receptor HER2 completo, las cuales escinden gran parte del dominio extracelular.

Estas formas truncadas de HER2 pueden contener neo-epítopes, esto es, nuevos determinantes antigénicos no presentes en la molécula del receptor entero, con lo cuál, no interaccionan de la misma manera con las moléculas que sí lo hacen con el receptor entero (anticuerpos, fármacos, etc.).

Según se ha mencionado anteriormente, los inventores localizaron que, sorprendentemente, la detección diferencial de dicha forma truncada de HER2 con SEQ ID NO: 1, correlaciona muy bien con la manifestación de un tipo de cáncer común en tejido mamario y de pronóstico pobre. Así, en la Fig. 3 pueden visualizarse gráficos que muestran los resultados de la evaluación del número de tumores desarrollados en ratones transgénicos que expresan la forma truncada CTF-611 (SEQ ID NO: 1).

Para obtenerse los resultados de esta Fig. 3, se expresaron en epitelio mamario de ratones construcciones de cDNA que codificaban por la SEQ ID NO: 1 humana (CTF-611), identificados en la figura según M611-CTF. La construcción comprende la SEQ ID NO: 1 bajo control del promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) (Mouse Mammary Tumor Virus). Como control se utilizó la línea de ratón FVB/N-Tg(MMTVneu)202J que expresa la forma completa de HER2, también bajo el control del promotor del MMTV. Según se desprende de la Fig. 3A, el número de tumores en los ratones que expresan la construcción de cDNA con la forma CTF-611 (SEQ ID NO: 1) es mucho mayor que el de la línea FVB/N-Tg(MMTVneu)202J, identificados en esta figura con la designación HER2/neu. Los tumores en los animales transgénicos se detectaron a las 17 semanas de edad de los animales transgénicos que expresan CTF-611, que representa tres meses antes de la primera detección en ratones FVB/N-Tg(MMTVneu)202J. Este hecho explicaría la mayor agresividad de tumores expresores de fragmentos de HER2 respecto de aquellos tumores expresores de la forma completa. En la Fig. 3B puede verse además, que el volumen de los tumores es mucho mayor en los animales que expresaban la forma truncada CTF de HER2 con la SEQ ID NO: 1, respecto de aquellos animales que expresan de forma constitutiva el receptor entero, también denominado HER2/neu. Este segundo hecho explica también la mayor agresividad de este tipo de tumores. Los inventores determinaron también que aquellos tumores que expresaban la forma truncada de secuencia SEQ ID NO: 1 presentaban unos índices de metástasis pulmonar superiores a los observados en los tumores que expresan HER2/neu.

Todos estos datos con animales transgénicos ponen de manifiesto que resulta muy necesaria la detección diferencial de la forma truncada del receptor HER2 de SEQ ID NO: 1 respecto de la forma completa del receptor. Esta detección diferencial puede llevarse a cabo mediante múltiples técnicas analíticas ampliamente conocidas por el experto en la materia como electroforesis de proteínas, cromatografías de exclusión molecular, ensayos de afinidad con anticuerpos, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, citometría de flujo, etc.

ES 2 342 646 B1

En los siguientes ejemplos pueden verse distintas formas de detectar la presencia de la forma truncada de secuencia SEQ ID NO: 1, en una muestra aislada de cáncer del tipo que expresa el receptor HER2 y/o sus variantes truncadas.

Ejemplo 1

5

Detección del fragmento de SEQ ID NO: 1 por migración diferencial

En la Fig. 2, que corresponde a una imagen de un gel de electroforesis y posterior transferencia tipo Western (Western-blot), se cargaron en los carriles distintas muestras de cáncer de mama (108, 114,101, 103, 131, 134 y 145). De cada muestra se analizó tanto la fracción soluble del lisado celular (S), como la fracción membrana (M) para visualizar qué tipo de molécula de HER2 estaba presente y en qué fracciones. En principio, se espera que tanto el receptor completo como la forma de la SEQ ID NO: 1 estén en la membrana celular. Para la detección de HER2 completo y de la forma CTF-611 se emplearon anticuerpos (CB11) dirigidos al dominio citoplasmático de las proteínas, que es un dominio común en ambas formas proteicas. Como control del análisis se detectó la presencia de la enzima Lactato deshidrogenada (LDH). En la mayoría de muestras aparecen bandas correspondientes al receptor HER2 entero y en la fracción membrana, una banda correspondiente a la forma CTF-611 de SEQ ID NO: 1.

La Fig. 2 demuestra entonces que la detección del tipo de formas truncadas del receptor HER2 puede llevarse a cabo mediante análisis por electroforesis de proteínas. Además, la presencia de un fragmento de HER2 de secuencia SEQ ID NO: 1 es indicativo de un determinado tipo de cáncer, en el caso del ejemplo, cáncer de mama, que debe ser evaluado y tratado como un caso particular dentro de los cánceres que expresan HER2.

Ejemplo 2

Detección de la presencia del fragmento de HER2 de secuencia SEQ ID NO: 1 con anticuerpos policlonales dirigidos a neo-epítomos definidos por la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3

Con la finalidad de poder detectar la presencia de la forma truncada de HER2, cuya secuencia es la descrita en SEQ ID NO: 1, con medios alternativos a los de la detección por migración diferencial en una electroforesis, se sintetizó un péptido con la SEQ ID NO: 4 y se inmunizaron cuatro conejos con dicho péptido. Este péptido corresponde a los 32 amino ácidos del extremo N-terminal de la forma CTF-611 o de SEQ ID NO:1, en el que la mayoría de cisteínas han sido sustituidas por serinas con la finalidad de conjugarlo con el inmunógeno conocido como Keyhole-limpet hemocyanin (KLH).

La SEQ ID NO: 4 corresponde pues a un péptido equivalente al de la SEQ ID NO: 3, aunque adaptado para llevar a cabo la técnica de inmunización. Un experto en la materia entenderá que los anticuerpos dirigidos contra el péptido de síntesis SEQ ID NO: 4 reconocerán también el epítopo definido por la SEQ ID NO: 3 presente en la forma truncada del receptor HER2 (SEQ ID NO: 1 o CTF-611). Del mismo modo, un experto en la materia puede deducir que si el péptido de síntesis empleado para la inmunización consiste en la SEQ ID NO: 2, que comprende todos los aminoácidos del receptor CTF-611 situados en la zona extracelular, los resultados con anticuerpos dirigidos contra este otro péptido son equivalentes y por ello útiles para el mismo fin.

Se realizó una electroforesis-SDS y posterior transferencia Western de extractos de lisados de células MCF7 (previamente transformadas con las construcciones de la Fig. 1), que expresaban la forma completa del receptor HER2, la forma truncada CTF-611 y la forma truncada p95. La forma truncada de SEQ ID NO: 1 apareció en realidad como dos fragmentos de peso molecular similar. Según se desprende con ensayos practicados con Glucosidasa-F, una enzima que elimina N-glicanos de las proteínas (no representados), el fragmento CTF-611 es sustrato de modificaciones post-traduccionales. Concretamente, un fragmento con aproximadamente 110 kDa corresponde a la forma que se sintetiza y que posteriormente entra en la ruta secretoria, en la cuál pasa a ser N-glicosilado.

El suero de dos de los conejos inmunizados reconoció tanto el receptor HER2 completo, como el CTF-611. Ello se deriva de la Fig. 4A, donde se detectan las bandas correspondientes tanto al receptor completo de HER2, como a la forma de SEQ ID NO: 1 o CTF-611. Según se indica en la citada Fig. 4A, el Western blot se reveló con un anticuerpo (CB11) que reconoce el dominio citoplasmático del receptor HER2 (dominio común en todas las formas, completa y truncadas); o bien con los anticuerpos policlonales generados contra el citado péptido de SEQ ID NO: 4 (α -611-A y α -611-B) y que están presentes en los sueros de los conejos. Por ser comparable la señal de HER2 completo y CTF-611, se deduce que los anticuerpos α -611-A y α -611-B reconocen un epítopo lineal que está presente en ambas formas del receptor. Como control negativo en la electroforesis-SDS y Western blot se utilizó un lisado de células MCF7 que expresaba la forma del receptor conocida como p95, la cuál no posee el epítopo contra el que se habían diseñado los anticuerpos.

En contraposición a dichos resultados, cuando se llevó a cabo un experimento de inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-A y α -611-B y el anticuerpo CB11, se detectó que los anticuerpos dirigidos contra el péptido de SEQ ID NO: 4 precipitaban de manera preferente la forma truncada del receptor (CTF-611). La mezcla que se sometió a inmunoprecipitación contenía una proporción 1:1:1 de los lisados celulares que expresaban las formas distintas del receptor HER2. Estos resultados son visibles en la Fig. 4B. En esta figura, aparecen las bandas de una electroforesis-SDS y posterior transferencia Western, en cuyos carriles se cargaron los resultados de los experimentos de inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-A, α -611-B y CB11. Se cargó un carril control (input) con la mezcla

ES 2 342 646 B1

1:1:1 de los tres tipos de lisados celulares sometida a inmunoprecipitación con los distintos anticuerpos. El Western blot se reveló con CB11.

En los carriles correspondientes a la inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-A y α -611-B, se distinguen claramente bandas más intensas que el resto en aquellos pesos moleculares correspondientes a la forma glicosilada y no glicosilada de CTF-611. Esto es, dichos anticuerpos dirigidos contra el péptido de SEQ ID NO: 4 no inmunoprecipitan la forma completa del receptor HER2, lo que significa que reconocen realmente un epítipo que está enmascarado cuando el receptor completo HER2 no está desnaturalizado. Por ello, puede concluirse que los anticuerpos α -611-A y α -611-B son específicos de CTF-611. Dicha especificidad se corrobora con ensayos de inmunofluorescencia indirecta (no representados) en los que los anticuerpos policlonales α -611-A y α -611-B únicamente permiten la tinción en muestras que expresan el fragmento truncado CTF-611. Este hecho conlleva la ventaja de poder ser utilizados para detectar de manera diferencial qué forma del receptor HER2 se expresa en una muestra aislada de tejido tumoral.

El receptor HER2 completo comprende, próxima a la membrana celular, una región estructurada mantenida por seis puentes disulfuro, señalizados en la Fig. 1 mediante líneas de conexión entre cisteínas. La forma truncada CTF-611, o de secuencia SEQ ID NO: 1, contiene únicamente cinco cisteínas entre las que se establecen dichos puentes disulfuro para estabilizar los homodímeros de esta forma truncada. Según se desprende de la Fig. 4 en su globalidad, debe deducirse que la zona próxima a la membrana celular de la forma truncada de SEQ ID NO: 1 es antigénicamente distinta de su equivalente en el receptor HER-2 completo. De ello, se desprende que puede ser detectada de manera diferencial según se ha indicado anteriormente.

Ejemplo 3

Detección de la presencia del fragmento de HER2 de secuencia SEQ ID NO: 1 con anticuerpos monoclonales dirigidos a neo-epítopes definidos por la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3

Utilizándose el mismo péptido de SEQ ID NO: 4 del ejemplo 2, se obtuvieron anticuerpos monoclonales. De todos ellos, se selecciona el anticuerpo monoclonal α -611-M3-C5 producido por la línea celular hibridoma con número de acceso DSM ACC2904. Los resultados obtenidos con este anticuerpo se detallan en la Fig. 5.

De igual forma que en el ejemplo 2, se realizó una electroforesis-SDS y posterior transferencia Western con una mezcla 1:1:1 de extractos de lisados de células MCF7 (previamente transformadas con las construcciones de la Fig. 1), que expresaban la forma completa del receptor HER2, o la forma truncada CTF-611, o la forma truncada p95. En la Fig. 5A, que es una fotografía de la membrana del Western revelada con CB11 o con el anticuerpo monoclonal α -611-M3-C5, puede verse que este último reconoce de manera específica la forma truncada de HER2 correspondiente al receptor CTF-611 de SEQ ID NO: 1 y no presenta reactividad cruzada detectable con la forma completa del citado receptor, lo que significa que reconoce realmente un nuevo epítipo (neo-epítipo) que incluye el grupo amino primario en el extremo N-terminal de la forma del receptor CTF-611.

De mismo modo, cuando se llevó a cabo un experimento de inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal α -611-M3-C5 en comparación con el anticuerpo CB11 (que reconoce el dominio citosólico de los receptores), se detectó que el anticuerpo monoclonal dirigido contra el péptido de SEQ ID NO: 3 precipitaba de manera exclusiva la forma truncada del receptor (CTF-611). Estos resultados son visibles en la Fig. 5B. En esta figura, aparecen los resultados de una electroforesis-SDS y posterior transferencia Western, en cuyos carriles se cargaron los resultados de los experimentos de inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-M3-C5 y CB11, y un carril control en el que se cargó una representación de la mezcla 1:1:1 de los distintos lisados celulares sometidos a inmunoprecipitación con los distintos anticuerpos.

En el carril correspondiente a la inmunoprecipitación con el anticuerpo α -611-M3-C5, se distinguen únicamente las bandas de la forma glicosilada y no glicosilada de la forma truncada CTF-611. Esto es, el anticuerpo α -611-M3-C5 no inmunoprecipita la forma completa del receptor HER2. Por ello, puede concluirse que el anticuerpo α -611-M3-C5 es altamente específico de CTF-611 y no reconoce la forma completa de HER2, pudiendo ser utilizado para detectar de manera diferencial y altamente selectiva qué forma del receptor HER2 se expresa en una muestra aislada de tejido tumoral.

Los ejemplos 2 y 3 muestran anticuerpos concretos. Evidentemente, son objeto de la invención otros anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra el epítipo de la forma truncada CTF-611 que queda definido por las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, puesto que, a partir de las enseñanzas de esta invención se derivan de manera directa para un experto en la materia. Del mismo modo, son objeto de la invención fragmentos de dichos anticuerpos, tal como F(ab), F(ab'), Fv, etc., o cualquier línea celular hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales dirigidos contra los péptidos de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO: 3.

De acuerdo con todo aquello mostrado anteriormente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos objeto de la presente invención se emplean como agentes de diagnóstico y determinación de pronóstico, ya sea marcados de manera directa en su misma secuencia peptídica (por ejemplo con radioisótopos) o de manera indirecta (por ejemplo por adición o unión a un agente fluorescente o capaz de producir fluorescencia por reacción en un medio de reacción seleccionado), todo ello con la finalidad de generar una señal visible, y a ser posible cuantificable, con la que detectar en una muestra la presencia de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1.

ES 2 342 646 B1

Del mismo modo, se prevé que el agente diagnóstico conteniendo al menos los anticuerpos pueda estar adherido a un soporte sólido, directa o indirectamente mediante un brazo espaciador. Un agente de este tipo permite capturar la forma de secuencia SEQ ID NO: 1 de una muestra, para determinar luego su presencia con otros anticuerpos ya no específicos (como el CB11).

5

Los agentes diagnósticos y de determinación de pronóstico objeto de la invención, pueden aplicarse también en protocolos de inmunohistoquímica. Para ello, los anticuerpos monoclonales o policlonales deben estar debidamente marcados para dar una señal visible, y en el mejor de los casos cuantificable, una vez han entrado en contacto con el tejido ensayado y se les ha permitido interactuar con las proteínas que pretenden ser detectadas, esto es, con el fragmento CTF de HER2 de secuencia SEQ ID NO: 1.

10

Con la finalidad de facilitar al facultativo la tarea del análisis, diagnóstico y determinación de pronóstico, se prevé que el agente diagnóstico esté comprendido en un kit que incluye, además, los reactivos, tampones y soluciones de detección adaptados para determinar en una muestra la presencia de la forma truncada de SEQ ID NO: 1.

15

Así, la invención proporciona un kit de diagnóstico y determinación de pronóstico que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo, dicho anticuerpo o fragmento capaz de reconocer el epítipo definido por la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO: 3, además de los medios de reacción y tampones apropiados para que se lleve a cabo la interacción del anticuerpo con el epítipo y que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia.

20

Otro tipo de kit también objeto de la invención, comprende todos aquellos medios necesarios para llevar a cabo una detección por migración diferencial de la forma truncada del receptor HER2, que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1, respecto de la forma completa del receptor HER2.

25

Los anticuerpos de esta invención son utilizados también dentro de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1. La composición comprende aquellos vehículos o excipientes aceptables farmacéuticamente y al menos un anticuerpo que reconoce el epítipo definido por la secuencias SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres del tipo que expresa el receptor HER2 y/o sus variantes truncadas, que comprende la detección de la presencia en la muestra de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la detección se lleva a cabo con medios seleccionados independientemente del grupo formado por: detección por migración diferencial de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1, respecto de la forma completa del citado receptor HER2; y detección por unión con anticuerpos específicos de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la detección se lleva a cabo con al menos un anticuerpo, específico de un epítipo definido por una secuencia incluida en la SEQ ID NO: 2.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, que comprende la detección del epítipo definido por la SEQ ID NO: 3 con al menos un anticuerpo.
- 5 5. Péptido aislado que consiste en la SEQ ID NO: 3.
- 6 6. Anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce un epítipo de una forma truncada del receptor HER2, dicho epítipo definido por una secuencia incluida en la SEQ ID NO: 2.
- 7 7. Anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce un epítipo de una forma truncada del receptor HER2, dicho epítipo definido por la SEQ ID NO: 3.
- 8 8. Anticuerpo o fragmento del mismo según las reivindicaciones 6 ó 7, que es un anticuerpo policlonal.
- 9 9. Anticuerpo o fragmento del mismo según las reivindicaciones 6 ó 7, que es un anticuerpo monoclonal.
- 10 10. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 9, producido por la línea celular hibridoma depositada en el "Deutschland Sammlung von Mikroorganismen und Zellen - DSMZ" con número de acceso DSM ACC2904.
- 11 11. Fragmentos del anticuerpo de las reivindicación 6 ó 7 seleccionados del grupo formado por F(ab), F(ab') y Fv.
- 12 12. Línea celular hibridoma con número de acceso DSM ACC2904 depositada en el "Deutschland Sammlung von Mikroorganismen und Zellen - DSMZ".
- 13 13. Uso de un anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para el diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2.
- 14 14. Agente de diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres del tipo que expresa el receptor HER2 o sus variantes truncadas, que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo según una de las reivindicaciones 6 a 11.
- 15 15. Agente diagnóstico según la reivindicación 14, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está dispuesto en un soporte sólido.
- 16 16. Kit de diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres del tipo que expresa el receptor HER2 o sus variantes truncadas, que comprende medios de detección de la presencia en la muestra de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1 donde dichos medios consisten en al menos un agente según las reivindicaciones 14 ó 15.
- 17 17. Kit de diagnóstico y determinación de pronóstico en muestras aisladas de cánceres del tipo que expresa el receptor HER2 o sus variantes truncadas, que comprende medios de detección de la presencia en la muestra de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1, donde dichos medios consisten en un sistema fase móvil-fase estacionaria donde se produce la migración diferencial de la forma truncada del receptor HER2 de SEQ ID NO: 1, respecto de la forma completa del citado receptor HER2.
- 18 18. Uso de un anticuerpo o de un fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 para la preparación de un medicamento.
- 19 19. Uso según la reivindicación 19, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de cánceres en los se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1.
- 20 20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, donde el medicamento es para el tratamiento o la prevención de cánceres de mama en mamíferos, incluyendo humanos.

ES 2 342 646 B1

21. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, donde el medicamento es para el tratamiento o la prevención de cánceres seleccionados del grupo constituido por cáncer de pulmón, páncreas, colon, estómago, próstata, cabeza y cuello, piel, riñón, testículo, tiroides, vejiga urinaria, útero, vulva, endometrio, ovario, esófago, boca, glándula salivar, laringe, peritoneo, región nasofaríngea, las trompas de Falopio, Wilms, así como linfomas, sarcomas de Swing, sarcoma synovial, meduloblastomas, trofoblásticos, gliomas, glioblastomas, colangiocarcinomas, colesteatoma, condrosarcoma, ependimoma, neurilemmomas, neuromas, rhabdomiosarcomas.

22. Composición farmacéutica destinada al tratamiento de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que contiene la SEQ ID NO: 1, **caracterizada** porque comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptables.

23. Método de obtención de un anticuerpo monoclonal, donde se cultiva la línea celular hibridoma según la reivindicación 12 en un medio de cultivo apropiado y se recupera el anticuerpo monoclonal de este medio.

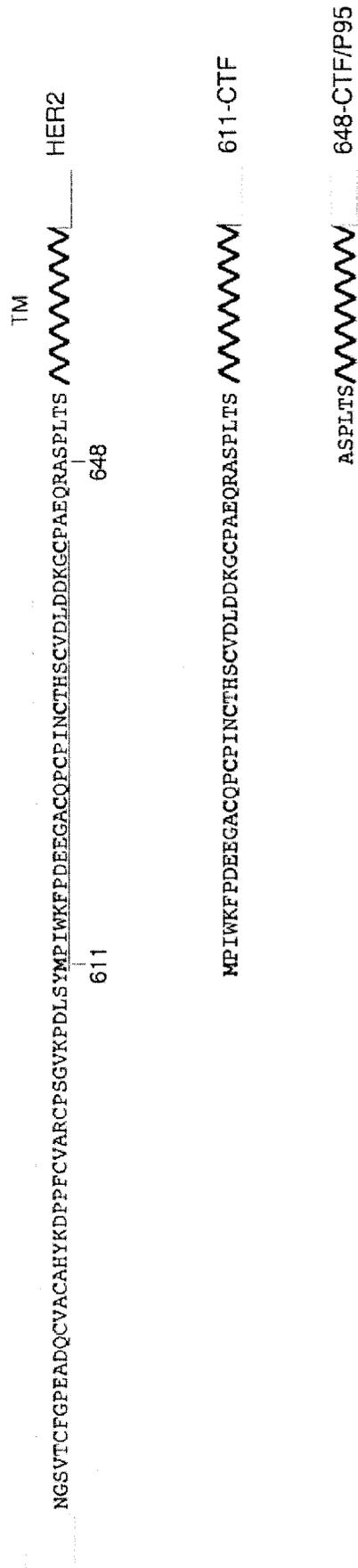


FIG. 1

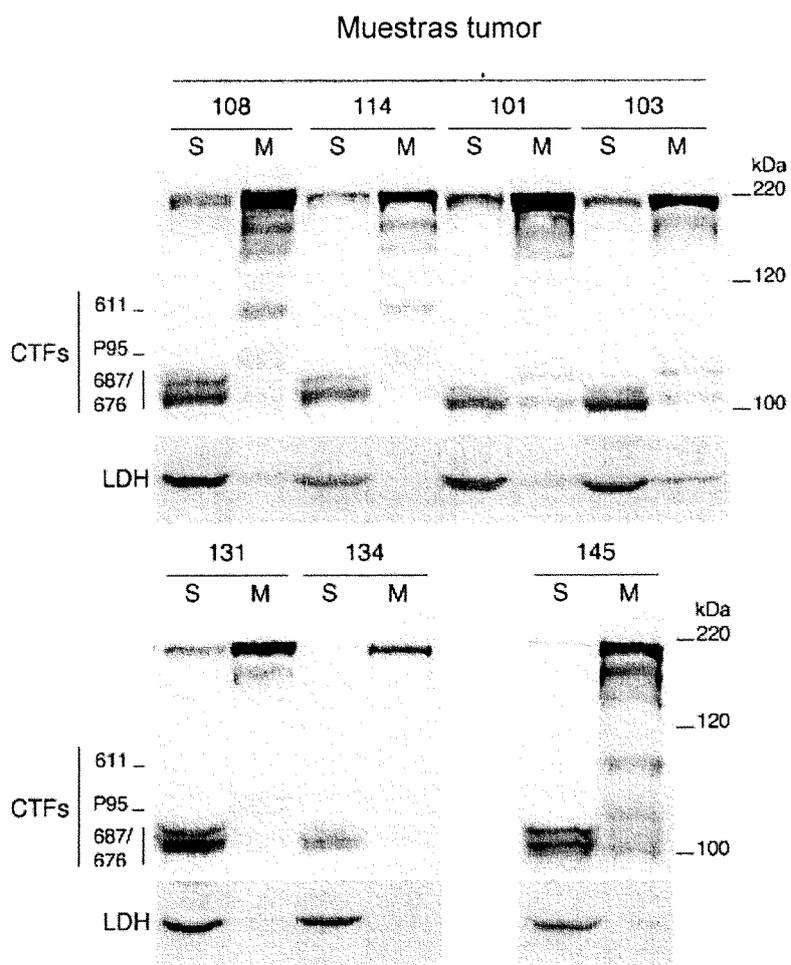


FIG. 2

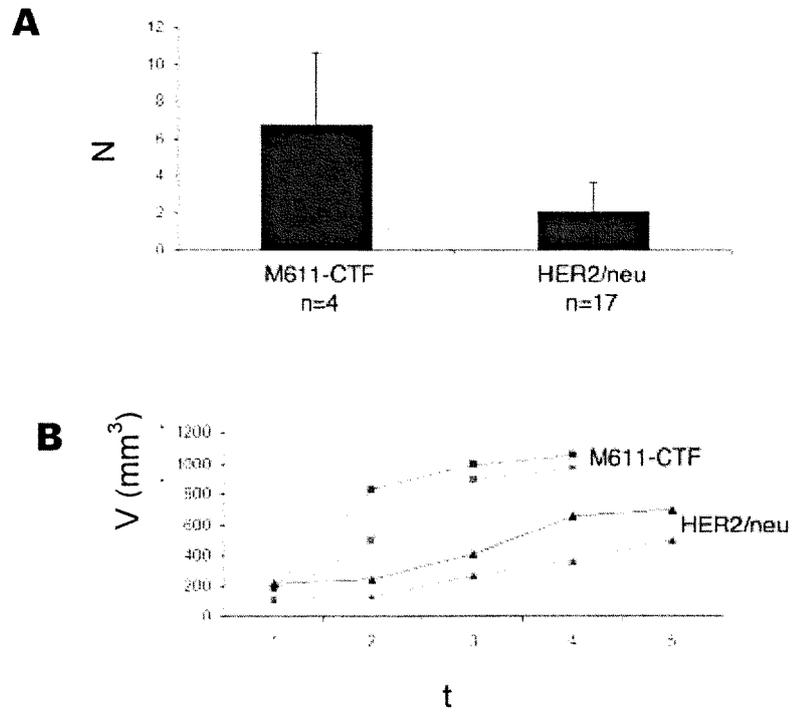


FIG. 3

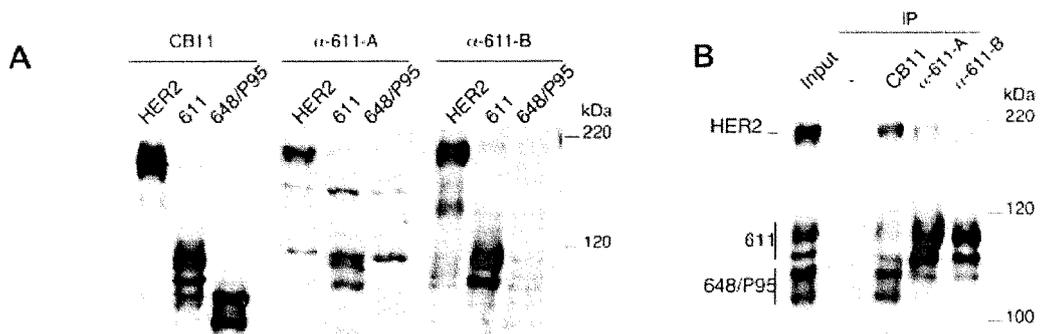


FIG. 4



FIG. 5

ES 2 342 646 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron/Fundació Privada Institut d'Investigació Oncològica de Vall d'Hebron (VHIO)/Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats

5

<120> Método de diagnóstico de cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas

<130> FO1104ES00

10

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 645

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25 Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
1 5 10 15

30 Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
20 25 30

35 Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser Ala Val
35 40 45

40 Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu
50 55 60

45 Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu
65 70 75 80

50 Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met
85 90 95

55 Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys
100 105 110

60 Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile
115 120 125

65

ES 2 342 646 B1

Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val
 130 135 140

5

Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu
 145 150 155 160

10

Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu
 165 170 175

15

Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro
 180 185 190

20

Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly
 195 200 205

25

Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser
 210 215 220

30

Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
 225 230 235 240

35

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu
 245 250 255

40

Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly
 260 265 270

45

Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg
 275 280 285

50

Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu
 290 295 300

55

Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu
 305 310 315 320

60

Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile
 325 330 335

65

Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp
 340 345 350

ES 2 342 646 B1

Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly
580 585 590

5

Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
595 600 605

10

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro
610 615 620

15

Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly
625 630 635 640

20

Leu Asp Val Pro Val
645

25

<210> 2
<211> 42
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Epítopo de una forma truncada de la proteína HER2 humana

<400> 2

40 Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
1 5 10 15

45 Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
20 25 30

50 Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
35 40

55 <210> 3
<211> 32
<212> PRT
60 <213> Artificial

<220>
<223> Epítopo de una forma truncada de la proteína HER2 humana

65

ES 2 342 646 B1

<400> 3

5 Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
1 5 10 15

10 Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
20 25 30

<210> 4

<211> 32

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <213> Péptido sintético derivado de un epítipo de una forma truncada de la proteína HER2 humana

<400> 4

25 Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Ser Gln Pro Ser
1 5 10 15

30 Pro Ile Asn Ser Thr His Ser Ser Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
20 25 30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 646

② N° de solicitud: 200801652

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.06.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ANIDO, J., SCALTRITI, M., BECH, J. J. et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. The EMBO Journal. Julio 2006, Vol. 25, N° 13, páginas 3234-3244. ISSN 0221-4189.	1-23
A	SCALTRITI, M., ROJO, F., OCAÑA, A. et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. Abril 2007, Vol. 99, N° 8, páginas 628-638. ISSN 1460-2105. <DOI:10.1093/jnci/djk134.>	1-23
A	ROJO, F., LANDOLFI, S., LIROLA, J. et al. Truncated HER2 receptor in breast cancer correlates with poor prognosis and trastuzumab resistance. Modern Pathology. Marzo 2007, Vol. 20, N° 2S, página 48A. ISSN 0893-3952.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.06.2010

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP, XPOAC, HCAPLUS, UNIPROT, aaGENESEQ, EURO PATENTS, JAPAN PATENTS, US PATENTS, KOREA PATENTS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ANIDO, J. et al. The EMBO Journal. Julio 2006, Vol. 25, N° 13, páginas 3234-3244.	07-2006
D02	SCALTRITI, M. et al. Journal of the National Cancer Institute. Abril 2007, Vol. 99, N° 8, páginas 628-638.	04-2007
D03	ROJO, F. et al. Modern Pathology. Marzo 2007, Vol. 20, N° 2S, página 48A.	03-2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto, un método de diagnóstico y pronóstico de cánceres que expresan HER2 y/o sus variantes truncadas, que comprende la detección de la presencia de la forma truncada de HER2 de secuencia SEQ. ID. NO. 1 (reivindicaciones de la 1 a la 4). Esta forma truncada (también denominada CTF-611) corresponde a una variante de HER2 cuyo inicio de la traducción se encuentra en la metionina 611. Los autores han comprobado que ratones transgénicos que expresaban CTF-611 en tejido epitelial, presentaban mayor número de tumores, éstos eran de mayor tamaño y tenían un mayor índice de metástasis pulmonar, que los que expresaban la forma no truncada de HER2. Además, comprobaron que el péptido de SEQ. ID. NO. 3 (correspondiente a los residuos extracelulares del 611 al 642 de HER2) comprende un epítipo que permite la detección específica de CTF-611 mediante anticuerpos. En consecuencia, también son objeto de la invención, el péptido de SEQ. ID. NO. 3 (reivindicación 5); los anticuerpos específicos frente al mismo y su uso en el método de diagnóstico o pronóstico (reivindicaciones de la 6 a la 11 y de la 13 a la 15); un kit de diagnóstico y pronóstico que los comprenda (reivindicaciones 16 y 17); el uso de los anticuerpos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cánceres que expresen la variante SEQ. ID. NO. 1 (reivindicaciones de la 18 a la 21); así como una composición farmacéutica que los comprenda (reivindicación 22). Por último, también se reivindica un hibridoma de número de acceso DSM ACC2904, productor de un anticuerpo monoclonal con dicha especificidad, y el método de producción de anticuerpos monoclonales que comprende el cultivo de esta línea celular (reivindicaciones 12 y 23).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 29.6, 29.7 Ley 11/1986)

El objeto de la presente solicitud según la reivindicación 1, es un método de diagnóstico y pronóstico en cánceres que expresan HER2 o sus variantes truncadas, que comprende la detección de la variante truncada de SEQ. ID. NO. 1. Por otro lado, el objeto de la reivindicación 6 es un anticuerpo que reconoce un epítipo específico de dicha forma truncada y que se encuentra en la SEQ. ID. NO. 2, y el de la reivindicación 5 un péptido de SEQ. ID. NO. 3, que es el citado epítipo específico para CTF-611.

D01 caracteriza los fragmentos carboxilo terminal de HER2 (también denominados CTFs o p95HER2) que se producen in vivo en la célula, afirmando que además del fragmento de 95 KD debido a la acción de una proteasa, se producen otros CTFs mediante traducciones alternativas a partir de las metioninas 611 y 687. La caracterización de estas variantes truncadas se realizó mediante western blot, utilizando un anticuerpo específico del dominio citoplasmático, común para todas las formas de HER2. Mediante la transfección de células con una secuencia codificante para una HER2 a la que se le ha delecionado la metionina inicial, consiguieron la expresión de los CTFs producidos mediante traducción alternativa. De este modo, comprobaron que las células transfectadas que expresaban dichos CTFs, tenían mucha mayor capacidad tumorigénica en los ratones nude. Estos tumores eran resistentes al tratamiento con herceptin, un anticuerpo que se une al dominio extracelular, aunque sí respondían frente a lapatinib, un inhibidor de la tirosín kinasa.

Hoja adicional

En D02 se presenta un estudio sobre la expresión de los CTFs de HER2 en tejido tumoral. Con el fin de poder detectar la expresión de estas variantes, se utilizó un anticuerpo específico del dominio citoplasmático capaz de detectar todas las formas de HER2, diferenciándose los CTFs de la proteína entera por su localización. Si se localiza la señal en el citoplasma, ésta es debida a la presencia de CTFs. Dicha localización se confirma mediante la colocalización de la señal del anticuerpo contra HER2 con la de señal emitida por un anticuerpo específico de citoqueratina. Así, mediante esta técnica se realizó un estudio retrospectivo en pacientes con cáncer de mama, comprobándose que las pacientes que expresaban las formas truncadas en tejido tumoral, mostraron con mayor frecuencia resistencia a trastuzumab, mientras que las que expresaban la proteína entera fueron más sensibles al tratamiento. Por lo tanto, el estudio del tipo de HER2 presente en el tejido tumoral permitiría seleccionar el tipo de terapia a elegir.

D03 divulga que la presencia de CTFs en cánceres de mama que sobreexpresan HER2, confiere una peor prognosis, y puede ser un mecanismo determinante de la sensibilidad frente al tratamiento con trastuzumab. Los CTFs se pueden detectar mediante una doble inmunofluorescencia en tejido: la doble tinción con un anticuerpo específico para el dominio extracelular y otro intracelular indicaría la presencia de HER2 completo, mientras que la tinción solo con el anticuerpo intracelular, indicaría la existencia de CTFs.

Aunque en los tres documentos se resalta la importancia de la presencia de CTFs en la evolución tumoral y la respuesta a tratamiento, aun conociendo que existen varias formas truncadas de HER2, no hacen diferenciación entre las mismas, ni apuntan la posibilidad de su estudio por separado.

En consecuencia, se considera que el método de diagnóstico y pronóstico de cánceres que expresen HER2 que comprende la detección de CTF-611 (reivindicación 1), el epítipo específico de esta variante (reivindicación 5) y el anticuerpo específico para dichos epítipo y variante truncada de HER2 (reivindicación 6) cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva.

Las reivindicaciones de la 2 a la 4 son dependientes de la reivindicación 1, y las reivindicaciones de la 7 a la 10, son dependientes de la 6. Por lo tanto, al igual que las reivindicaciones de las que dependen, también cumplen los requisitos del PCT con respecto a novedad y actividad inventiva.

Al presentar el anticuerpo novedad y actividad inventiva, el hibridoma que lo produce y la obtención del anticuerpo a partir de dicho hibridoma (reivindicaciones 12 y 23); el uso del anticuerpo en el diagnóstico o pronóstico de cánceres que expresan HER2 (reivindicación 13); los agentes diagnósticos o kits que lo comprendan (reivindicaciones de la 14 a la 17); el uso del anticuerpo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres que expresan la forma truncada de HER2 de SEQ. ID. NO. 1 (CTF-611) (reivindicaciones de la 18 a la 21) y la composición farmacéutica que lo comprende (reivindicación 22), tienen novedad y actividad inventiva.