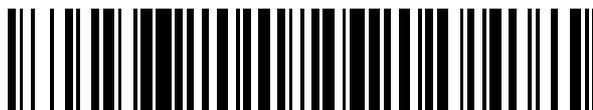


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 132**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2009 E 09772265 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2293819**

54 Título: **Método para diagnosticar cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas**

30 Prioridad:

02.06.2008 ES 200801652

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

04.02.2015

73 Titular/es:

FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL UNIVERSITARI VALL HEBRON (33.3%) Passeig Vall d'Hebron 119-129 Edifici de Recerca 08035 Barcelona, ES; FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANCATS (33.3%) y FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ ONCOLÒGICA DE VALL D'HEBRON (33.3%)

72 Inventor/es:

**ARRIBAS LÓPEZ, JOAQUÍN;
PEDERSEN, KIM;
ANGELLINI, PIER-DAVIDE;
PARRA PALAU, JOSEP LLUIS;
LAOS, SIRLE y
BASELGA TORRES, JOSÉ**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 528 132 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para diagnosticar cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas

5 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico en muestras aisladas de cánceres que expresan el receptor HER2. La invención también proporciona compuestos para su uso en el diagnóstico y la identificación tempranos del cáncer así como para su uso en terapia.

Técnica anterior

10 HER2 (también conocido como c-erbB2, ErbB2 o Neu) es una proteína transmembrana de tipo I que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico o EGFR, también conocida como HER1 o ErbB1. Dos miembros adicionales, HER3 y HER4 completan esta familia. Cuando HER1, 3 ó 4 se une a un ligando de tipo EGF, su dominio extracelular adopta la conformación denominada "abierta", que permite la formación de homodímeros y heterodímeros. Aunque no se une a ningún ligando, HER2 también interacciona con otros receptores HER unidos a un ligando, debido al hecho de que su dominio extracelular es de conformación constitutivamente "abierta".

15 La dimerización dirigida por el dominio extracelular conduce a la interacción de la cinasa intracelular de los receptores HER y a la posterior fosforilación de algunos residuos de tirosina. Estas fosfotirosinas actúan como acopladores de un grupo de proteínas de unión a fosfotirosina intracelular. Las interacciones establecidas en la membrana plasmática se transducen al núcleo celular por medio de diferentes rutas de señalización, tales como la ruta de la proteína cinasa activada por proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la ruta de la proteína cinasa activada por estrés (JNK), fosfolipasa C gamma, etc. Todos estos circuitos de señalización controlan la expresión de genes que actúan de manera coordinada para modificar aspectos determinantes del estado de la célula, tales como proliferación, migración, supervivencia y adhesión celular. Por tanto, dependiendo del contexto celular, la activación de los receptores HER da como resultado una respuesta celular drástica, que puede oscilar entre la transformación en una célula maligna y una senescencia prematura.

20 Además del modo de señalización canónico, los receptores HER o fragmentos de los mismos pueden endocitarse y transportarse al núcleo, donde pueden regular directamente la expresión de determinados genes. Este hecho se ha observado para el caso específico 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, págs. 251-261), así como para un fragmento carboxilo terminal (CTF), que consiste en una forma truncada del receptor HER4, que incluye toda la parte citoplasmática (Linggi *et al.*, "ErbB-4 s80 intracellular domain abrogates ETO2-dependent transcriptional repression", J. Biological Chemistry-2006, Vol. 281, págs. 25373-25380).

25 En tumores de mama humanos, se ha encontrado a menudo una serie de fragmentos carboxilo terminales o CTF, que se supone 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, págs. 347-353). También se sabe que pacientes con cáncer de mama que expresan los CTF de HER2, o lo que viene a ser lo mismo, formas truncadas que no incluyen el extremo N-terminal de HER2 (CTF de HER2), tienen una mayor probabilidad de desarrollar metástasis (Molina *et al.* 2002, citado anteriormente) y un pronóstico peor que aquellas pacientes que expresan principalmente la forma completa de HER2 (Saez *et al.*, "p95HER2 predicts worse outcome in patients with HER2-positive breast cancer", Clinical Cancer Research-2006, Vol. 12, págs. 424-431).

Por tanto, es muy importante poder detectar la presencia de HER2 en tumores a tiempo e incluso más importante determinar si está en una forma completa o truncada (CTF).

30 Actualmente, a nivel de las pruebas clínicas de rutina se usan anticuerpos para detectar la presencia de la forma completa de HER2, con el fin de determinar el tipo de tumor de mama en cuestión. En el caso de detectar la presencia de HER2, la terapia recomendada consiste en administrar anticuerpos monoclonales terapéuticos, tales como trastuzumab de Genentech. El uso de este anticuerpo monoclonal para el tratamiento del cáncer se describe en la solicitud WO 8906692 a nombre de Genentech. El documento WO 8906692 describe anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra la región extracelular de HER2, correspondiendo esta región extracelular con la parte externa completa de la proteína, que es su extremo N-terminal. Tal como se mencionó anteriormente, los epítomos reconocidos por los anticuerpos citados en el documento WO 8906692 son regiones antigénicas del dominio extracelular de la forma completa de HER2 y no se incluyen en las formas truncadas o fragmentos carboxilo terminales de HER2. Por tanto, con los anticuerpos y el método de diagnóstico descrito en el documento WO 8906692 no será posible detectar la presencia de HER2 truncado (CTF). Además, en los tumores de mama en los que se expresan dichos CTF de HER2, los anticuerpos tales como trastuzumab no son terapéuticos, ya que no reconocen ningún epítipo. Este hecho explica la resistencia al tratamiento con trastuzumab observada en pacientes que expresan formas truncadas (CTF) de HER2.

35 Las pacientes que expresan formas truncadas o CTF de HER2 deben tratarse con terapias alternativas con el fin de evitar los números de mal pronóstico observados por Saez *et al* 2006 (citado anteriormente). Con el fin de detectar

(diagnosticar) y tratar lo antes posible personas que tienen tumores en los que se expresan formas truncadas de HER2, es muy interesante poder distinguir qué forma de HER2 se expresa con el fin de actuar en consecuencia.

5 El documento de Anido *et al.*, "Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation", European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal - 2006, Vol. 25, págs. 3234-3244, describe que además del fragmento generado por la acción de las alfa-secretasas en el 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) a través de un mecanismo de inicio alternativo de la traducción que comienza a partir de dos metioninas ubicadas en el sentido de 5' y en el sentido de 3', respectivamente, del dominio transmembrana de HER2. Específicamente, las metioninas para el inicio alternativo de la traducción corresponden a 10 la metionina 611 y la metionina 687 de la secuencia de aminoácidos con número de registro M11730.1 de la base de datos UniGene del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Este documento también muestra que estas formas alternativas del receptor HER2 (CTF) están presentes en tumores de mama. En particular, indica que las más abundantes corresponden a la forma conocida como CTF687, o en otras palabras, a la proteína obtenida 15 mediante el inicio alternativo de la traducción que comienza a partir de la metionina en la posición 687. Anido *et al.* proponen como terapia el uso de inhibidores de la actividad tirosina cinasa de HER2, tales como lapatinib, con el fin de minimizar el crecimiento de los tumores que expresan estas formas truncadas de HER2. Los inhibidores de las tirosina cinasas actúan mediante la interacción con el extremo C-terminal del receptor HER2 que está presente de manera integral tanto en el receptor completo como en los CTF derivados del mismo o producidos mediante el inicio 20 alternativo de la traducción.

El documento de Scaltriti *et al.*, "Expression 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, págs. 628-368, representa un ejemplo de un estudio dando lugar a una metodología alternativa para detectar la presencia de una de las formas 25 truncadas del receptor HER2 y enumera algunas de las posibles causas de resistencia al tratamiento con trastuzumab (Herceptin). En particular, hace hincapié en la acumulación del fragmento p95HER2 (producto de la proteólisis de HER2 mediante alfa-secretasas) y otras formas truncadas del receptor, que no tienen el dominio extracelular reconocido por Trastuzumab. Scaltriti propone un método de inmunofluorescencia para detectar el fragmento p95HER2 (producto de proteólisis mediante alfa-secretasas). Este nuevo método de detección puede 30 llevarse a cabo en cortes de tejido embebidos en parafina y fijados con formalina siguiendo protocolos clínicos. La nueva metodología surge de la observación de que la forma truncada p95HER2, y no la forma entera del receptor, se ubica tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de la célula. Este método propone comparar si hay expresión de p95HER2 por medio de la tinción del citoplasma detectado con un anticuerpo anti-HER2 que se une al dominio citoplasmático del receptor; y confirmar estos resultados con los de una detección con un anticuerpo anti-citoqueratina, una proteína cuya distribución se ha usado ampliamente como herramienta para el diagnóstico de 35 tumores. Sin embargo, no está claro si este método distingue de manera eficaz aquellos tumores que expresan la forma completa de HER2 de aquéllos que expresan las formas truncadas.

40 Existe la necesidad de ubicar dianas nuevas y eficaces para el diagnóstico y la terapia, correlacionadas de manera apropiada con el tipo de cáncer en cuestión y que hagan posible tratar a tiempo con terapias eficaces aquellos tumores que tienen el peor pronóstico, descartando desde el inicio aquellas terapias que se ha observado que no son eficaces.

45 La presente invención ofrece beneficios relacionados con los problemas citados anteriormente y representa una solución novedosa en la clasificación temprana del cáncer, específicamente del cáncer de mama.

Sumario de la invención

50 Se ha determinado que la presencia de una de las formas truncadas (CTF) de HER2, generada mediante el inicio alternativo de la traducción, se correlaciona muy bien con la predicción del tipo de cáncer que va a tratarse, haciendo más fácil la tarea del médico en el momento de recetar un ciclo de tratamiento. Se ha identificado esta forma truncada de HER2 (CTF-611) y se ha encontrado que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1.

55 Se ha usado esta secuencia para desarrollar varias herramientas para detectar su presencia en muestras de tejido, proporcionando así un nuevo y sólido conjunto de diagnóstico que también es aplicable en la rutina clínica.

60 La presente invención también proporciona nuevos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que reconocen esta forma truncada o CTF de HER2, que no se reconoce por trastuzumab. Estos anticuerpos reconocen un epítipo que se define por una secuencia incluida en SEQ ID NO: 2. La invención también proporciona líneas celulares de hibridoma adecuadas para producir tales anticuerpos. Los anticuerpos anti-HER2 disponibles actualmente reconocen CTF y HER2 o sólo HER2, haciendo muy difícil discriminar pacientes que expresan sólo HER2 de pacientes que expresan HER2 y CTF. A diferencia de los anticuerpos anti-HER2 disponibles, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen preferentemente a CTF-611, permitiendo la identificación de pacientes que expresan este CTF.

65 La presente invención también se refiere a un método de diagnóstico de cáncer en muestras de paciente que

comprende la detección de la presencia en dicha muestra de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1.

5 La presente invención también proporciona el uso del anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención para el diagnóstico y la determinación del pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2.

10 La presente invención proporciona además un agente de diagnóstico y determinación del 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 tal como se describió anteriormente.

15 La presente invención también proporciona un kit de diagnóstico y determinación del pronóstico en muestras aisladas de cánceres, en los que se expresa el receptor HER2, que comprende medios para detectar la presencia en dicha muestra de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1.

La invención también proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo tal como se describió anteriormente para su uso en terapia o en la fabricación de un medicamento 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.

20 Según otra característica de la invención, el uso de anticuerpos o fragmentos es para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir cánceres de mama en mamíferos, incluyendo seres humanos.

25 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para el tratamiento de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1, que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo tal como se describió anteriormente y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1: Diagrama de la secuencia de proteínas de la forma truncada CTF-611, en comparación con la secuencia del receptor HER2 completo y con la forma truncada conocida como p95 (648-CTF/p95), producto de la proteólisis mediante alfa-secretasas. El dominio transmembrana se representa como una línea helicoidal. El resto de la molécula se indica con un recuadro gris. La secuencia del péptido usado para generar anticuerpos mono y policlonales aparece subrayada. Las posiciones de los puentes disulfuro intramoleculares también se indican con conexiones entre las cisteínas.

35 Figura 2: Electroforesis e inmunotransferencia de tipo Western (transferencia a membrana) de muestras de cáncer de mama. (S) significa fracción soluble y (M) fracción de membrana. Con el fin de detectar HER2 completo y la forma CTF-611, se usaron anticuerpos dirigidos al dominio citoplasmático de las proteínas. DHL: Lactato deshidrogenasa (usado como control).

40 Figura 3: Resultados de la evaluación del número de tumores desarrollados en ratones transgénicos que expresan la forma truncada CTF-611 (figura 3A) en comparación con ratones transgénicos que expresan el receptor HER2 completo; y los resultados del volumen de tumores detectados (figura 3B). En el eje Y, N y V significan Número de tumores y Volumen de tumores, respectivamente. En el eje X, T se refiere al Tiempo en semanas.

45 Figura 4: La figura 4A muestra una electroforesis y una inmunotransferencia de tipo Western (transferencia a membrana) revelada con un anticuerpo (CB11) que reconoce el dominio citoplasmático del receptor HER2 (dominio común en todas las formas completas y truncadas) o 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 lisado de células MCF7 (transformados previamente con los constructos de la figura 1) que expresan la forma completa del receptor HER2, la forma truncada CTF-611 y la forma truncada p95. La figura 4B muestra el resultado de un ensayo de inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-A, α -611-B y CB11 llevado a cabo en muestras que contenían tanto el receptor HER2 completo como las formas truncadas CTF-611 y p95.

50 Figura 5: (A) Se lisaron células MCF7 que expresan HER2, 611-CTF o 648-CTF y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western con CB11, un anticuerpo contra el dominio citoplasmático de HER2, o con dos anticuerpos monoclonales independientes anti-611-CTF producidos contra el péptido MPIWKFPDEEGASQPSPINSTHSSVDLDDKGC (véase la figura 1). (B) Se mezclaron los lisados de células MCF7 que expresan HER2, 611-CTF o 648-CTF 1:1:1 y se sometieron a inmunoprecipitación con los anticuerpos monoclonales indicados. Se analizaron los inmunoprecipitados lavados mediante inmunotransferencia de tipo Western con el anticuerpo CB11. Se realizó una inmunoprecipitación simulada sin anticuerpo (-) como control negativo. (C) Se analizaron las células MCF7 que expresan HER2, 611-CTF o 648-CTF en un microscopio confocal mediante inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos indicados.

65 Figuras 6 (A) y (B): Caracterización de un anticuerpo monoclonal mediante citometría de flujo.

Figura 7: Caracterización de anticuerpos monoclonales mediante inmunohistoquímica.

Figura 8: Caracterización de epítomos. Figura 8(A): Gráfico que muestra la secuencia principal de la región yuxtamembrana de 611-CTF y la secuencia de los diferentes constructos usados para mapear los epítomos. Figura 8(B) Inmunotransferencias de tipo Western.

Figura 9: Análisis de muestras de cáncer de mama. Figura 9(A) Tabla con resultados analíticos. Figura 9(B) Tinción inmunocitoquímica.

Descripción detallada

CTF-611

Tal como se mencionó anteriormente, los inventores encontraron que, de manera sorprendente, la detección diferencial de dicha forma truncada de HER2 con SEQ ID NO: 1 se correlaciona muy bien con la manifestación de un tipo común de cáncer en tejido de mama con un mal pronóstico. Por tanto, la figura 3 muestra los resultados de la evaluación del número de tumores desarrollados en ratones transgénicos que expresan la forma truncada CTF-611 (SEQ ID NO: 1).

Con el fin de obtener los resultados de esta figura 3, se expresaron constructos de ADNc en el epitelio de mama de ratones, codificando dichos constructos para la SEQ ID NO: 1 humana (CTF-611), identificada en la figura como M611-CTF. Este constructo comprende la SEQ ID NO: 1 bajo el control del promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV). Como control se usó la línea de ratón FVB/N-Tg(MMTVneu)202J que expresa la forma completa de HER2, también bajo el control del promotor de MMTV. Tal como puede deducirse de la figura 3A, el número de tumores en ratones que expresan el constructo de ADNc con la forma CTF-611 (SEQ ID NO: 1) es mucho mayor que el de la línea FVB/N-Tg(MMTVneu)202J, identificada en esta figura con la designación HER2/neu. Se detectaron los tumores en los animales transgénicos a las 17 semanas de edad de los animales transgénicos que expresaban CTF-611, lo que representa tres meses antes de la primera detección en ratones FVB/N-Tg(MMTVneu)202J. Este hecho explicaría la agresividad mayor de los tumores que expresan fragmentos de HER2 en relación con los tumores que expresan la forma completa. La figura 3B también muestra que el volumen de los tumores es mucho mayor en los animales que expresan la forma truncada CTF de HER2 con SEQ ID NO: 1, en relación con los animales que expresan constitutivamente el receptor completo, también conocido como HER2/neu. Este segundo hecho también explica la agresividad mayor de este tipo de tumores. Los inventores también determinaron que los tumores que expresan la forma truncada de secuencia SEQ ID NO: 1 mostraron mayores índices de metástasis pulmonar que los observados en los tumores que expresan HER2/neu. En el ejemplo 9 más adelante se proporcionan experimentos adicionales que demuestran la relevancia clínica.

Todos estos datos con animales transgénicos revelan que la detección diferencial de la forma truncada del receptor HER2 de SEQ ID NO: 1 con respecto a la forma completa del receptor es muy necesaria.

Estas formas truncadas de HER2 pueden contener neo-epítomos, en otras palabras, nuevos determinantes antigénicos no presentes en la molécula del receptor completo, lo que significa que no interactúan de la misma manera con las moléculas como con el receptor completo (anticuerpos, medicamentos, etc.).

Anticuerpos frente a CTF-611

Los inventores pudieron producir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales frente a CTF-611. Estos anticuerpos reconocen un epítomo que se define por una secuencia incluida en SEQ. ID NO: 2, preferiblemente por una secuencia incluida en o definida por SEQ. ID NO: 3. Los más preferidos son anticuerpos que reconocen un epítomo que está incluido en o está definido por MPIWKFPDEEGAS (SEQ. ID NO: 5).

En el contexto de la presente invención, se entiende que epítomo significa la parte de una macromolécula de tipo peptídico (o de un antígeno), cuya secuencia y/o configuración espacial se reconoce por el sistema inmunitario (anticuerpos, células T, células B).

Los anticuerpos de la presente invención pueden distinguir preferiblemente la proteína de SEQ ID NO: 1 del receptor HER2. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden distinguir preferiblemente la proteína de SEQ ID NO: 1 de la forma truncada 648-CTF/p95 del receptor HER2. Esta distinción puede visualizarse por una o más de inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica en células cultivadas e inmunohistoquímica en muestras de pacientes. Se prefiere particularmente que la distinción pueda cuantificarse tanto en citometría de flujo como en inmunoprecipitación.

Según la presente invención, la unión de los anticuerpos de la presente invención a 611-CTF en un experimento de inmunoprecipitación es preferiblemente al menos 300 veces, más preferiblemente al menos 1000 veces, lo más

preferiblemente de 1000 a 2000 veces más fuerte que su unión a HER2, tal como se describe más detalladamente en el ejemplo 3 (usando 5 microgramos de 32H2 y 5 microgramos de 20F4),

Tal como se indicó anteriormente, el anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal.

En el sentido de la presente invención, "anticuerpo policlonal" se entiende que significa el grupo de anticuerpos producidos por líneas de células B diferentes (linfocitos B). Los anticuerpos policlonales son mezclas de inmunoglobulinas secretadas contra un antígeno (macromolécula), pudiendo reconocer cada una de estas inmunoglobulinas a un epítipo diferente, ya que proviene de una célula B diferente. Por tanto, dentro de las diferentes poblaciones de inmunoglobulinas contenidas en un anticuerpo policlonal, hay un tipo de inmunoglobulina que reconoce el epítipo o epítipos de interés de un antígeno específico.

Los anticuerpos policlonales pueden producirse por ejemplo conjugando el péptido de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 con un inmunógeno tal como hemocianina de lapa californiana e inmunizando conejos con este conjugado.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando inmunógenos iguales o similares. Las líneas celulares de hibridoma pueden producirse de manera conocida por el experto. Entonces puede hacerse crecer la línea celular de hibridoma en un medio de cultivo adecuado a partir del cual se recupera el anticuerpo monoclonal.

En una realización preferida, se producen por la línea celular de hibridoma depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - DSMZ" con número de registro DSM ACC2904 según el Tratado de Budapest de 9 de abril de 2008 o por la línea celular de hibridoma depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - DSMZ" con número de registro DSM ACC2980 según el Tratado de Budapest de 6 de noviembre de 2008.

Se prefieren particularmente anticuerpos monoclonales producidos por estas líneas celulares de hibridoma, así como anticuerpos monoclonales que son al menos equivalentes desde el punto de vista funcional. Al menos equivalentes desde el punto de vista funcional son aquellos anticuerpos que pueden discriminar entre CTF-611 y HER2 igualmente bien o incluso mejor.

Los anticuerpos útiles también incluyen anticuerpos humanizados y humanos.

Por tanto, la presente invención también proporciona los péptidos aislados de secuencia SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

En lugar del anticuerpo completo, puede usarse un fragmento del mismo según la presente invención. Los fragmentos de anticuerpo se seleccionan del grupo comprendido por F(ab), F(ab') y Fv. En el contexto de la presente invención, un fragmento de un anticuerpo se refiere a una parte del anticuerpo que es de tamaño suficiente y de estructura apropiada para unirse a un epítipo presente en la forma truncada del receptor HER2 y por tanto para permitir su detección en una muestra.

Los ejemplos 2 y 3 muestran anticuerpos específicos. Evidentemente, la invención se extiende a otros anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra el epítipo de la forma truncada CTF-611 que se define por las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, ya que, basándose en las enseñanzas de esta invención, pueden obtenerse directamente por un experto en la técnica. Igualmente, la invención se extiende a fragmentos de dichos anticuerpos, tales como F(ab), F(ab'), Fv, etc., o a cualquier línea celular de hibridoma que puede producir anticuerpos monoclonales dirigidos contra los péptidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

Métodos de diagnóstico

En el método de diagnóstico según la invención, la detección de la presencia de la forma truncada del receptor HER2 puede llevarse a cabo a través de medios seleccionados independientemente del grupo que comprende: detección mediante migración diferencial en un sistema de fase móvil – fase estacionaria de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1 con respecto a la forma completa de dicho receptor HER2; y detección mediante unión con anticuerpos específicos de la forma truncada del receptor HER2 que contiene la SEQ ID NO: 1.

Detección a través de migración diferencial debe entenderse que significa, en el contexto de la presente invención, cualquier técnica analítica que permite la separación de los compuestos que van a detectarse basándose en su diferente movilidad en un sistema de fase móvil – fase estacionaria específico, tal como una electroforesis. Tal movilidad diferente puede provocarse por una carga eléctrica diferente en el compuesto, peso molecular diferente o afinidad diferente por otros compuestos.

Esta detección diferencial puede llevarse a cabo a través de técnicas analíticas conocidas por el experto en la técnica tales como electroforesis de proteínas, cromatografías de exclusión molecular, pruebas de afinidad de

anticuerpos, inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, citometría de flujo, etc. Se prefiere particularmente la inmunohistoquímica. Uno o más de estos métodos pueden combinarse para potenciar la fiabilidad.

5 La detección diferencial de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1, también denominada en esta invención CTF-611, con respecto al receptor HER2 completo o total, implica poder visualizar dos proteínas con diferentes pesos moleculares y diferentes secuencias tal como puede desearse a partir de la figura 1. La forma truncada con SEQ ID NO: 1 consiste en la proteína que resulta del inicio alternativo de la traducción a través de la metionina 611 de la secuencia completa del receptor HER2. Por tanto, esta forma o CTF
10 comprende 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 figura 1 denominada p95 o CTF-648. Esta última forma es el producto de la acción de las alfa-secretasas en el receptor HER2 completo, que dividen una gran parte del dominio extracelular.

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

20 En una realización de la invención, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención se usan como agentes para el diagnóstico y la determinación del pronóstico, o bien marcados directamente en su propia secuencia peptídica (por ejemplo con radioisótopos) o bien indirectamente (por ejemplo mediante la adición o unión de un agente fluorescente o un agente que puede producir fluorescencia mediante la reacción en un medio de reacción seleccionado), teniendo todos los anteriores el objetivo de generar una señal visible, y si es posible
25 cuantificable, con la que detectar la presencia de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 en una muestra.

De la misma manera, se contempla que el agente de diagnóstico que contiene al menos los anticuerpos se adhiera a un soporte sólido, directa o indirectamente por medio de un brazo espaciador. Un agente de este tipo permite
30 capturar la forma de secuencia SEQ ID NO: 1 de una muestra, con el fin de determinar su presencia después con otros anticuerpos no específicos (tales como CB11).

Los agentes de diagnóstico y determinación del pronóstico según la invención también pueden aplicarse en protocolos de inmunohistoquímica. Para este efecto, los anticuerpos monoclonales o policlonales (primarios o secundarios) deben estar debidamente marcados para producir una señal visible, y en los mejores casos
35 cuantificable, una vez que han entrado en contacto con el tejido sometido a prueba y han podido interactuar con las proteínas cuya detección se desea, en otras palabras, con el fragmento CTF de HER2 de secuencia SEQ ID NO: 1.

40 Con el objetivo de facilitar la tarea de análisis, diagnóstico y determinación del pronóstico al médico, se contempla que el agente de diagnóstico se proporcione en forma de un kit que incluye, además de los anticuerpos, los reactivos (por ejemplo reactivos requeridos para la tinción inmunohistoquímica), tampones y disoluciones de detección adaptadas para determinar la presencia de la forma truncada de SEQ ID NO: 1 en una muestra, posiblemente portaobjetos de control que representan diferentes niveles de expresión de CTF-611 y posiblemente también
45 instrucciones detalladas, que ayudan al médico en la evaluación del diagnóstico. Este kit también puede comprender un medio para llevar a cabo un ensayo inmunohistoquímico semicuantitativo para la determinación de HER2 (tal como Herceptin™).

Por tanto, la invención proporciona un kit para el diagnóstico y la determinación del pronóstico, que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo, pudiendo reconocer dicho anticuerpo o fragmento el epítipo
50 definido por SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, además de los medios reactivos y tampones adecuados para llevar a cabo la interacción del anticuerpo con el epítipo y que conocen ampliamente los expertos en la técnica.

55 El método de diagnóstico de la presente invención, y el kit de la presente invención, puede permitir la predicción de metástasis ganglionar, mal pronóstico y resistencia a Herceptin™.

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

Dentro del grupo 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 incluyen el cáncer de pulmón, páncreas, colon, estómago, próstata, cabeza y cuello, piel, riñón, testículo, tiroides, vejiga urinaria, útero, vulva, endometrio, ovario, esófago, boca, glándula salival, laringe, peritoneo, región nasofaríngea, trompas de Falopio, tumores de Wilms así como linfomas, sarcomas de Swing, sarcoma sinovial, meduloblastomas, tumores trofoblásticos, gliomas,

glioblastomas, colangiocarcinomas, colesteatoma, condrosarcoma, ependimoma, neurilemomas, neuromas, rabdomiosarcomas. Por tanto, el método de diagnóstico de la presente invención es particularmente adecuado para diagnosticar uno de estos cánceres. Además de la detección *ex vivo* de CTF, los anticuerpos pueden usarse para la obtención de imágenes *in vivo*.

5

Métodos terapéuticos

Los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, también son útiles en terapia, particularmente en la terapia del cáncer, particularmente en aquellos cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas. Se prefieren anticuerpos humanizados y humanos, y fragmentos de los mismos.

10

También se usan los anticuerpos de esta invención en composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1. La composición comprende aquellos vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y al menos un anticuerpo que reconoce el epítipo definido por las secuencias SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. La composición farmacéutica también puede comprender una mezcla de anticuerpos que, además de un anticuerpo de la presente invención, contiene otros anticuerpos contra HER2 o fragmentos de los mismos, tales como Herceptin™.

15

Basándose en las figuras proporcionadas en el presente documento y siempre a modo de ejemplo ilustrativo pero no limitativo, a continuación se describen el método de diagnóstico y determinación del pronóstico de cánceres en los que se expresan el receptor HER2 y/o sus fragmentos carboxilo terminales (variantes truncadas); nuevos péptidos y anticuerpos específicos contra dichos péptidos; nuevas líneas celulares; agentes y kits de diagnóstico para detección, siendo todos ellos objetos de la invención.

20

Aunque no se especifica, todos los términos técnicos y científicos usados en la memoria descriptiva tienen el significado que un experto en la técnica, a la que pertenece la invención, les asignaría. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y variaciones de la palabra, tal como "que comprende", no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención se volverán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

25

30

Además, se entenderá que la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de grupos preferidos y particulares descritos anteriormente.

35

Ejemplos

Los siguientes ejemplos muestran diferentes maneras 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.

40

Procedimientos experimentales

Células. Se mantuvieron células MCF7 Tet-Off (BD bioscience) a 37°C y CO₂ al 5% en DMEM/F-12 (1:1) (Gibco) que contenía FBS al 10% (Gibco), L-glutamina 4 mM (PAA Laboratories), G418 0,2 mg/ml (Gibco) y doxiciclina 1 µg/ml (Sigma). Se transfectaron las células con los diversos plásmidos de expresión usando FuGENE6 (Roche). Se seleccionaron clones estables individuales con plásmidos basados en pUHD10-3h integrados con higromicina B 0,1 mg/ml (Invitrogen). Se indujo la expresión de ADNc codificados por pUHD10-3h de HER2 y CTF retirando la doxiciclina. En primer lugar, se separaron las células con Tripsina al 0,5%-EDTA (GIBCO), se lavaron tres veces mediante centrifugación y se cambió el medio 10 horas después de la siembra en placas de cultivo. Se comprobó la homogeneidad de los clones individuales mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra el dominio citoplasmático de HER2. En los experimentos se usaron dos clones estables seleccionados independientemente.

45

50

Inmunotransferencia de tipo Western. Se lisaron las células que expresaban las diferentes isoformas de HER2 en tampón RIPA modificado (NaH₂PO₄ 20 mM/NaOH pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 5 mM, PMSF 100 mM, NaF 25 mM, aprotinina 16 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml y Na₃VO₄ 1,3 mM) y se determinaron las concentraciones de proteínas con reactivos de ensayo de proteínas DC (BIO-RAD). Se mezclaron las muestras con tampón de carga (concentraciones finales: Tris 62 mM pH 6,8, glicerol al 12%, SDS al 2,5%) con beta-mercaptoetanol al 5% y se incubaron a 99°C durante 5 min antes del fraccionamiento de 15 µg de proteína mediante SDS-PAGE. Se cuantificaron las señales específicas en inmunotransferencias de tipo Western con el software ImageJ 1.38 (NIH).

55

60

Inmunoprecipitación. Se incubaron los lisados celulares con diferentes anticuerpos durante 1 hora a 4°C. Entonces, se purificaron los inmunocomplejos con la proteína A. Se lavaron los inmunoprecipitados tres veces con tampón de lisis, se mezclaron con tampón de carga y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western.

65

Se lavaron las células para la microscopía de inmunofluorescencia sembradas en portaobjetos de vidrio con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% durante 10 min. Para el bloqueo y la unión al anticuerpo se usó PBS con BSA al 1%, saponina al 0,1% y NaN₃ al 0,02%, y para la preparación se usó Vectashield con DAPI (Vector laboratories).

5 Citometría de flujo. Se lavaron células MCF7 que expresan HER2, 611-CTF o 648- a 4°C con PBS y se separaron en PBS que contenía 5 mM de EDTA. Se incubaron las células separadas con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-32H2 en PBS que contenía 5% de BSA durante 30 min a 4°C, se lavaron y se tiñeron durante 30 min a 4°C con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Becton-Dickinson) en PBS que contenía un 5% de BSA. La citometría de flujo se realizó en un FACscan usando el software FACscan Research (Becton Dickinson Immunocytometry Sys., Mountain View, CA).

15 Inmunohistoquímica. Se lavaron células MCF7 que expresaban HER2, 611-CTF o 648- a 4°C con PBS y se separaron en PBS que contenía 5 mM de EDTA. Entonces, se centrifugaron las células y se fijaron los sedimentos celulares en formalina neutra al 10%, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Se colocaron cortes de los sedimentos celulares o de tejidos humanos de un grosor de 4 µm en portaobjetos de vidrio cubiertos con poli-lisina. Se realizaron análisis de inmunohistoquímica usando el siguiente protocolo:

20 1. Desparafinar y rehidratar el corte
 1.1 Incubar los portaobjetos 30 min a 60°C.
 1.2 Desparafinar los portaobjetos con tres incubaciones de 5 min de xileno transparente, seguido por dos lavados de 3 min con etanol absoluto.

25 1.3 Llevar gradualmente a agua destilada: Etanol 95°C 3 min, etanol 70°C 3 min, etanol 50°C 3 min, agua destilada.

2. Recuperar antígenos
 30 PT Link a pH bajo (6), disolución de recuperación de diana Envision Flex a pH alto 10x. DM 812. 20 min a 95°C. Lavar con tampón de lavado Envision Flex x10, DM 811, 15 min.

3. Tinción inmunohistoquímica

35 AUTOSTAINER más Link DAKO
 Kit Envision Flex + ratón, pH alto (Link):

40 Bloqueo de peroxidasa Envision Flex SM801.

Envision Flex/ HRP SM 802.

Envision Flex DAB+cromógeno DM 807.

45 Tampón de sustrato Envision Flex SM 803.

Tampón de lavado Envision Flex 10x DM 811.

50 Disolución de recuperación de diana Envision Flex a pH alto 10x DM 812.

Envision Flex+ ratón (ligador) SM 84.

Peroxidasa 5 min y lavado con tampón de lavado.

55 Bloqueo de proteínas al 5%, 15-20 min.

Lavar con tampón de lavado.

60 • 32H2 diluido 1:1000-1:3000 (disolución madre 1 mg/ml) o 20F4 diluido 1:20-1:50 (disolución madre 1 mg/ml) 2 horas.

• Lavar con tampón de lavado.

65 • Secundario (Flex HRP, Flex+ratón/conejo) 20 min.

- Lavar con tampón de lavado.
- DAB 5 min.
- Lavar con tampón de lavado.
- Hematoxilina.
- Lavar con agua destilada.

5

10

3. Deshidratar y estabilizar con medio de preparación

3.1 Lavar gradualmente con concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 95%, 2 min cada lavado).

15

3.2 Llevar gradualmente a agua destilada (etanol al 95%, al 70%, al 50%, agua destilada, 3 min cada lavado).

3.3 Lavar con xileno/eucaliptol (3 lavados 2 min cada uno).

3.4 Realizar preparación con DPX.

20

Ratones transgénicos

Se modificaron por ingeniería genética ratones TG 611 y TG 687 clonando las secuencias que codifican para 687-CTF y 611-CTF en el sitio de clonación múltiple II en el sentido de 3' de la repetición terminal larga del virus del tumor mamario de ratón potenciado por el virus del sarcoma de Rous del vector pMB (un amable obsequio del Dr. Marcos Malumbres, CNIO, Madrid). Se generaron las líneas fundadoras microinyectando ADN de plásmido linealizado en oocitos fertilizados recogidos de ratones FVB superovulados en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica, Universitat Autònoma de Barcelona). Se genotiparon los ratones fundadores mediante análisis de hibridación de tipo Southern. Tras la identificación de los animales fundadores, se realizó mantenimiento de colonias de rutina mediante genotipado por PCR. Se obtuvieron los ratones FVB/N-Tg(MMTVneu)202J macho y hembra del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

25

30

Histología y preparaciones completas

35

Se prepararon las glándulas mamarias en portaobjetos de vidrio, se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% y se transfirieron a etanol al 70%. Se aclararon los portaobjetos en agua durante 5 min y se tiñeron en una disolución filtrada de carmín al 0,2% durante 24 horas. Entonces se deshidrataron secuencialmente las glándulas con concentraciones decrecientes de etanol, luego se desgrasaron y almacenaron en salicilato de metilo. Para el análisis histológico, se bloquearon en parafina las glándulas fijadas, se realizaron cortes, y se tificaron con hematoxilina y eosina.

40

Ejemplo 1: Detección del fragmento de SEQ ID NO: 1 a través de migración diferencial.

45

En la figura 2, que corresponde a una imagen de un gel de electroforesis y la posterior transferencia de tipo Western (inmunotransferencia de tipo Western), se cargaron diferentes muestras de cáncer de mama (108, 114, 101, 103, 131, 134 y 145) en los carriles. A partir de cada muestra se analizaron tanto la fracción soluble (S) como la fracción de membrana (M) del lisado celular, con el fin de 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 usaron anticuerpos (CB11) dirigidos al dominio citoplasmático de las proteínas, que es un dominio común en ambas formas de proteína. Como control de análisis se detectó la presencia de la enzima lactato deshidrogenasa (DHL). En la mayoría de las muestras, aparecen bandas correspondientes al receptor HER2 completo y en la fracción de membrana, una banda correspondiente a la forma CTF-611 de SEQ ID NO: 1.

50

55

Por tanto, la figura 2 muestra que la detección del tipo de formas truncadas del receptor HER2 puede llevarse a cabo a través de un análisis de 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 necesita evaluarse y tratarse como un caso individual dentro de los cánceres que expresan HER2.

60

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 SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

65

Con el objetivo de poder detectar la presencia de la forma truncada de HER2, cuya secuencia es la descrita en SEQ ID NO: 1, usando medios alternativos a los de la detección por migración diferencial en electroforesis, se sintetizó un péptido que tiene la secuencia SEQ ID NO: 4 y se inmunizaron cuatro conejos con dicho péptido. Este péptido

corresponde a los 32 aminoácidos del extremo N-terminal de la forma CTF-611 o de SEQ ID NO: 1, en el que la mayoría de las cisteínas se han sustituido por serinas con el fin de conjugarlas con el inmunógeno conocido como hemocianina de lapa californiana (KLH).

5 Por tanto, la SEQ ID NO: 4 corresponde a un péptido equivalente al de SEQ ID NO: 3, aunque adaptado con el fin de llevar a cabo la técnica de inmunización. Un experto en la técnica entenderá que los anticuerpos dirigidos contra la SEQ ID NO: 4 del péptido sintetizado también reconocerán el epítipo definido por la SEQ ID NO: 3 presente en la forma truncada del receptor HER2 (SEQ ID NO: 1 o CTF-611). De manera similar, un experto en la técnica puede deducir que si el péptido sintetizado usado para la inmunización consiste en SEQ ID NO: 2, que comprende todos los aminoácidos del receptor CTF-611 ubicados en la zona extracelular, los resultados con anticuerpos dirigidos contra este otro péptido son equivalentes y por tanto útiles para el mismo fin.

10 Se llevaron a cabo una electroforesis con SDS y posterior transferencia de tipo Western de extractos de lisado de células MCF7 (transformados previamente con los constructos de la figura 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 de hecho como dos fragmentos de peso molecular similar. Como puede deducirse de las pruebas realizadas con glicosidasa-F, una enzima que elimina N-glicanos de proteínas (no mostrado), el fragmento CTF-611 es un sustrato de modificaciones postraduccionales. Específicamente, un fragmento con aproximadamente 110 kDa corresponde a la forma que se sintetiza y posteriormente entra en la ruta secretora, en la que se convierte en N-glicosilado.

15 El suero de dos de los conejos inmunizados reconoció tanto el receptor HER2 completo como CTF-611. Esto puede observarse en la figura 4A, en la que se detectan las bandas correspondientes tanto al receptor HER2 completo como a la forma de SEQ ID NO: 1 o CTF-611. Tal como se indica en dicha figura 4A, la inmunotransferencia de tipo Western se reveló con un anticuerpo (CB11) que reconoce el dominio citoplasmático del receptor HER2 (dominio común a todas las formas, completa y truncadas); o con los anticuerpos policlonales generados contra dicho péptido de SEQ ID NO: 4 (α -611-A y α -611-B) y que están presentes en los sueros de conejos. Dado que es comparable con la señal del HER2 completo y CTF-611, se concluye que los anticuerpos α -611-A y α -611-B reconocen un epítipo lineal que está presente en ambas formas del receptor. Como control negativo en la electroforesis con SDS e inmunotransferencia de tipo Western se usó un lisado de células MCF7 que expresaba la forma del receptor conocida como p95, que no posee el epítipo contra el que se habían diseñado los anticuerpos.

20 En contraposición a estos resultados, cuando se llevó a cabo un ensayo 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 preferiblemente la forma truncada del receptor (CTF-611). La mezcla que se sometió a inmunoprecipitación contenía una proporción de 1:1:1 de los lisados celulares que expresaban las diferentes formas del receptor HER2. Estos resultados son evidentes en la figura 4B. En esta figura, aparecen las bandas de una electroforesis con SDS y posterior transferencia de tipo Western, en cuyos carriles se cargaron los resultados de los ensayos de inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-A, α -611-B y CB11. Se cargó un carril control (entrada) con la mezcla 1:1:1 de los tres tipos de lisados celulares sometidos a inmunoprecipitación con los diferentes anticuerpos. La inmunotransferencia de tipo Western se reveló con CB11. (Se lisaron aproximadamente 10⁶ células que expresaban HER2 de longitud completa, 611-CTF o 648-CTF en 500 μ l de tampón de lisis (Tris HCL 50 mM pH 7,4, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10%, NP40 al 1%). Se clarificaron los lisados centrifugando a 14000 g x 30 minutos.

45 Entrada: 5 μ l de mezcla de lisado (HER2 de longitud completa:CTF611:CTF648, 1:1:1)

IP: 50 μ l de mezcla de lisado + 5 μ l de suero anti-611 CTF de conejo o CB11

50 En los carriles correspondientes a la inmunoprecipitación con los anticuerpos α -611-A y α -611-B, pueden distinguirse bandas que son claramente más intensas que el resto en aquellos pesos moleculares correspondientes a la forma glicosilada y no glicosilada de CTF-611. Es decir, dichos anticuerpos dirigidos contra el péptido de SEQ ID NO: 4 no inmunoprecipitaban la forma completa del receptor HER2, lo que significa que reconocen realmente un epítipo que está enmascarado cuando el receptor HER2 completo no está desnaturalizado. Por tanto, puede concluirse que los anticuerpos α -611-A y α -611-B son específicos para CTF-611.

55 Esta especificidad se corrobora mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (no mostrados) en los que los anticuerpos policlonales purificados por afinidad α -611-A y α -611-B sólo permiten la tinción en muestras que expresan el fragmento truncado CTF-611. Este hecho implica la ventaja de poder usarlos para detectar de manera diferencial qué forma del receptor HER2 se expresa en una muestra aislada de tejido tumoral. La purificación por afinidad de los anticuerpos policlonales se realizó del siguiente modo:

60 (i) Purificación de IgG total usando una columna HiTrap Protein A HP (GE Healthcare). Se inmovilizaron anticuerpos de suero de conejo en la columna equilibrada con tampón de unión (Na₂HPO₄), se lavaron con 10 volúmenes de columna de tampón de unión y se eluyeron en 10 volúmenes de ácido cítrico pH (2,7). Se neutralizó la elución usando Tris-HCL pH 8.

65

(ii) Purificación usando un péptido inmovilizado en una columna HiTrap NHS. Se inmovilizó el mismo péptido usado para inmunizar el conejo en una columna HiTrap NHS. Se cargaron las IgG purificadas en la etapa anterior en la columna equilibrada con tampón de unión (Na_2HPO_4), se lavaron con 10 volúmenes de columna de tampón de unión y se eluyeron en 10 volúmenes de ácido cítrico pH (2,7). Se neutralizó la elución usando Tris-HCL pH 8.

(iii) Finalmente el anticuerpo purificado se dializó contra PBS NaN_3 al 0,02%.

El receptor HER2 completo comprende, cerca de la membrana celular, una región estructurada mantenida por seis puentes disulfuro, indicados en la figura 1 mediante líneas de conexión entre cisteínas. La forma truncada CTF-611, o de secuencia SEQ ID NO: 1, contiene sólo cinco cisteínas entre las que se establecen dichos enlaces disulfuro para estabilizar los homodímeros de esta forma truncada. Como puede deducirse de la figura 4 en su totalidad, debe concluirse que la zona próxima a la membrana celular de la forma truncada de SEQ ID NO: 1 es antigénicamente diferente de su equivalente en el receptor HER2 completo. De ello, se deduce que puede detectarse de manera diferencial según lo que se ha indicado anteriormente.

La cuantificación de las diferentes isoformas de HER2 en los inmunoprecipitados de entrada, CB11 y anti-611-B normalizados con respecto a la cantidad de apariciones de HER2 es tal como sigue:

	Entrada	CB11	Anti -611-B
HER2	1	1	1
611-CTF	1,47	1,27	23,20
648-CTF	1,53	2,76	2,4

La cuantificación se llevó a cabo usando ImageJ 1.38.

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

Usando el mismo péptido de SEQ ID NO: 4 del ejemplo 2, se obtuvieron anticuerpos monoclonales. De todos ellos, se seleccionaron el anticuerpo monoclonal 20F4 producido por la línea celular de hibridoma con número de registro DSM ACC2904 y el anticuerpo monoclonal 32H2 producido por la línea celular de hibridoma con número de registro DSM ACC2980. Los resultados obtenidos con este anticuerpo se muestran en la figura 5.

De una manera similar a la del ejemplo 2, se llevó a cabo una electroforesis con SDS y la posterior transferencia de tipo Western con una mezcla 1:1:1 de extractos de lisado de células MCF7 (transformados previamente con los constructos de la figura 1), que expresaban la forma completa del receptor HER2, o la forma truncada CTF-611, o la forma truncada p95. En la figura 5A, que es una fotografía de la membrana del Western revelada con CB11 o con los anticuerpos monoclonales 20F4 y 32H2, puede observarse que estos últimos reconocen específicamente la forma truncada de HER2 correspondiente al CTF-611 de receptor de SEQ ID NO: 1 y no presenta ninguna reactividad cruzada detectable con la forma completa de dicho receptor, lo que significa que reconoce realmente un nuevo epítomo (neo-epítomo) que incluye el grupo amino primario en el extremo N-terminal de la forma CTF-611 del receptor.

De una manera similar, cuando se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación con los anticuerpos monoclonales 20F4 y 32H2 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 exclusivamente la forma truncada del receptor (CTF-611). Estos resultados resultan evidentes en la figura 5B. En esta figura, se muestran los resultados de una electroforesis con SDS y la posterior transferencia de tipo Western, en cuyos carriles se cargaron los resultados de los ensayos de inmunoprecipitación con los anticuerpos 20F4, 32H2 y CB11.

En el carril correspondiente a la inmunoprecipitación con los anticuerpos 20F4 y 32H2, sólo pueden distinguirse las bandas de la forma glicosilada y no glicosilada de la forma truncada CTF-611. Es decir, los anticuerpos 20F4 y 32H2 no inmunoprecipitan la forma completa del receptor HER2. Por tanto, puede concluirse que los anticuerpos 20F4 y 32H2 son altamente específicos para CTF-611 y no reconocen la forma completa de HER2, lo que significa que pueden usarse para la detección diferencial y altamente selectiva de qué forma del receptor HER2 se expresa en una muestra aislada de tejido tumoral.

La caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un péptido correspondiente a la secuencia, de 32 aminoácidos de longitud, N-terminal, de 611-CTF, confirma la existencia de epítomo(s) enmascarado(s) en HER2 de longitud completa pero expuesto(s) en 611-CTF. Estos epítomos están enmascarados tanto en la molécula solubilizada como en células intactas. La cuantificación de las diferentes isoformas de HER2 en los inmunoprecipitados CB11, 32H2 y 20F4 normalizados con respecto a la cantidad de apariciones de HER2 es tal como sigue:

	CB11	32H2	20F4
HER2	1	1	1
611-CTF	1,01	343,50	1302,19
648-CTF	0,79	nd	nd

Ejemplo 4: Caracterización de un anticuerpo monoclonal contra el extremo N-terminal de 611-CTF mediante citometría de flujo

5 (A) Se analizaron células MCF77 que expresaban HER2, 611-CTF o 648-CTF mediante citometría de flujo usando diferentes concentraciones de 32H2, un anticuerpo monoclonal producido contra el péptido MPIWKFPDEEGASQPSPINSTHSSVDLDDKGC (véase la figura 1). Véase la figura 6(A).

10 (B) Se cuantificaron los resultados de dos experimentos independientes realizados como en (A) y se muestran los promedios. Véase la figura 6(B).

(C) Se analizaron células MCF7 que expresaban HER2, 611-CTF o 648-CTF en un microscopio confocal mediante inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos indicados.

15 Como anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488 de Invitrogen (A110011). Para evaluar la unión no específica como control negativo, se llevó a cabo FACS sin suero 32H2 pero en presencia de este anticuerpo secundario ("2ary").

20 Conclusión: El epítipo reconocido por el anticuerpo 32H2 está expuesto en células vivas que expresan 611-CTF pero enmascarado en células vivas que expresan HER2.

Ejemplo 5: Caracterización de anticuerpos monoclonales contra el extremo N-terminal de 611-CTF mediante inmunohistoquímica

25 Se llevó a cabo tinción inmunohistoquímica de células MCF7 que expresaban HER2, 611-CTF o 648-CTF con CB11, un anticuerpo contra el dominio citoplasmático de HER2, o con dos anticuerpos monoclonales independientes anti-611-CTF producidos contra el péptido MPIWKFPDEEGASQPSPINSTHSSVDLDDKGC (véase la figura 1). El resultado se muestra en la figura 7.

30 Conclusiones. Los epítipos reconocidos por los anticuerpos 20F4 y 32H2 están expuestos en células que expresan 611-CTF analizadas mediante inmunohistoquímica. En contraposición, evaluado con la misma técnica, estos epítipos están enmascarados en la molécula HER2 de longitud completa. Este resultado es particularmente relevante debido al hecho de que la inmunohistoquímica es la técnica de elección para la mayoría de las pruebas de rutina en la práctica clínica.

Ejemplo 6: Caracterización de los epítipos reconocidos por los anticuerpos monoclonales contra el extremo N-terminal de 611-CTF

40 (A) Esquema que muestra la secuencia principal de la región yuxtamembrana de 611-CTF. Se indican los extremos N y C-terminal de la molécula. Se indican los dominios transmembrana y cinasa mediante un recuadro rayado y uno gris, respectivamente. Se indica la secuencia de los diferentes constructos de delección. Véase la figura 8(A).

45 (B) Se lisaron células MCF-7 transfectadas transitoriamente con constructos de delección de ADNc comenzando en los aminoácidos indicados. Se analizaron los lisados celulares mediante inmunotransferencia de tipo Western con CB11, un anticuerpo contra el dominio citoplasmático de HER2, o con dos anticuerpos monoclonales independientes anti-611-CTF producidos contra el péptido MPIWKFPDEEGASQPSPINSTHSSVDLDDKGC. Véase la figura 8(B).

50 Conclusiones. Los epítipos reconocidos por los anticuerpos 32H2 y 20F4 están contenidos en o al menos se solapan con la secuencia MPIWKFPDEEC.

Ejemplo 7: Análisis de muestras de cáncer de mama humano con un anticuerpo monoclonal contra el extremo N-terminal de 611-CTF o con Herceptest™

55 (A) En las muestras indicadas, se analizó la expresión de HER2 con Herceptest™, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o inmunotransferencia de tipo Western. Se indican aquellas muestras que expresaron niveles detectables de fragmentos carboxilo terminales de HER2 (también conocidos como P95) evaluado mediante inmunotransferencia de tipo Western (véase (Scaltriti, M., Rojo, F., Ocana, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J., y Baselga, J. (2007) J Natl Cancer Inst 99(8), 628-638)). Véase la figura 9(A).

60

(B) Tinción inmunocitoquímica de las mismas muestras de cáncer de mama que en A, con 32H2, un anticuerpo monoclonal anti-611-CTF producido contra el péptido MPIWKFPDEEGASQPSPINSTHSSVDLDDKGC (véase la figura 1) o con Herceptest™, que tiñe el dominio citoplasmático de HER2. Véase la figura 9(B).

- 5 Conclusión. Mediante inmunohistoquímica, el anticuerpo 32H2 tiñe muestras de cáncer de mama humano de las que se conocía previamente que expresaban niveles detectables de CTF, evaluado mediante inmunotransferencia de tipo Western.

10 Ejemplo 8: Generación de modelos animales para caracterizar el efecto de la expresión de CTF *in vivo*

- 10 Los modelos de ratón han jugado un papel decisivo a la hora de mostrar el potencial oncogénico y la relevancia de HER2 en la evolución tumoral. Para caracterizar su potencial oncogénico, se han establecido ratones transgénicos (TG) que expresan 611-CTF bajo el control de la repetición terminal larga de virus del tumor mamario de ratón, que es preferentemente activo en la glándula mamaria. Aunque los modelos celulares indicaron que los CTF intracelulares solubles son inactivos, para explorar adicionalmente las consecuencias de la expresión de estos fragmentos, también se generaron animales TG que expresaban 687-CTF. Como control, se ha usado el modelo clásico y bien caracterizado que expresa HER2 de tipo natural (es decir rat neu).

- 20 A las 7 semanas de edad, los niveles de 611-CTF expresados en las líneas F3 y F2 de TG 611 heterocigotas eran ~ iguales a y 1/3 de, respectivamente, los niveles de HER2 endógeno, aunque el nivel en F1 era inferior al umbral de detección. Los niveles de 687-CTF en las líneas homocigotas desarrolladas variaron desde ~ el doble hasta la mitad de los niveles de HER2 en las líneas F2 y F1 de TG 687, respectivamente.

- 25 Las glándulas mamarias de los animales TG no presentaron anomalías macroscópicas a las 7 semanas de edad. Sin embargo, el examen morfológico de preparaciones completas teñidas con carmín reveló anomalías hiperplásicas en los árboles ductales mamaros de ratones TG HER2. Estaban presentes anomalías similares, aunque menos pronunciadas, en las tres líneas de ratones TG 611. En contraposición, las glándulas de ratones TG 687 no podían distinguirse de las de ratones de tipo natural.

- 30 Ejemplo 9: La expresión de 611-CTF conduce al desarrollo de tumores mamaros agresivos

A pesar de la hiperplasia más pronunciada en ratones TG HER2, las tres líneas de animales TG 611 desarrollaron tumores más agresivos en cuanto al número de tumores por animal, crecimiento tumoral y aparición del tumor:

- 35 Glándulas mamarias

Ratones	Promedio (semanas)	n
HER2 (Neu)	30,3 ± 7,5	22
611-F1	26,3 ± 4,6	6
611-F2	22,2 ± 4,8	12
611-F3	23,7 ± 5,5	3

(Se monitorizó la aparición de los tumores mamaros mediante palpación semanalmente.)

- 40 No se observaron tumores o anomalías en animales TG 687 incluso tras un seguimiento de más de un año.

El análisis histológico de los tumores mostró los mismos carcinomas nodulares sólidos invasivos típicos inducidos por HER2 en los ratones TG 611. La única diferencia histológica entre los tumores iniciados por HER2 y 611-CTF fue un número mayor de imágenes mitóticas en los de los ratones TG 611.

- 45 Tal como se mostró anteriormente, los ratones TG HER2 desarrollaron metástasis pulmonar. Tres a seis semanas tras la detección de tumores, ~ 1/4 de los animales TG HER2 tenían nódulos detectables en los pulmones:

Ratones	Metástasis pulmonar	n
HER2 (Neu)	22	9
611-F1, F2, F3	56	9

(Se sacrificaron los ratones 3-6 semanas tras la detección del tumor mediante palpación y se monitorizó la aparición de metástasis mediante inmunohistoquímica).

- 50 El análisis histológico de las metástasis pulmonares confirmó la expresión de HER2 y la tinción con citoqueratina 18 verificó que las células se originaban del tumor primario. En comparación con TG HER2, el número de animales que expresan 611-CTF con metástasis detectables fue más del doble. Esto muestra que los tumores iniciados por este CTF tienen una tendencia más pronunciada a invadir los pulmones.

- 55 Secuencias

ES 2 528 132 T3

SEQ ID NO: 1

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
 1 5 10 15
 Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
 20 25 30
 Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser Ala Val
 35 40 45
 Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu
 50 55 60
 Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu
 65 70 75 80
 Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met
 85 90 95
 Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys
 100 105 110
 Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile
 115 120 125
 Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val
 130 135 140
 Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu
 145 150 155 160
 Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu
 165 170 175
 Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro
 180 185 190
 Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly
 195 200 205
 Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser
 210 215 220
 Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
 225 230 235 240

ES 2 528 132 T3

Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu
 245 250 255
 Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly
 260 265 270
 Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg
 275 280 285
 Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu
 290 295 300
 Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu
 305 310 315 320
 Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile
 325 330 335
 Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp
 340 345 350
 Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg
 355 360 365
 Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu
 370 375 380
 Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu
 385 390 395 400
 Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro
 405 410 415
 Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met
 420 425 430
 Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp
 435 440 445
 Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro
 450 455 460
 Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu
 465 470 475 480
 Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro
 485 490 495
 Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser
 500 505 510

ES 2 528 132 T3

Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu
515 520 525
Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu
530 535 540
Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Ala
545 550 555 560
Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala
565 570 575
Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly
580 585 590
Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
595 600 605
Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro
610 615 620
Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly
625 630 635 640
Leu Asp Val Pro Val
645

SEQ ID NO: 2

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
1 5 10 15
Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
20 25 30
Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
35 40

5

SEQ ID NO: 3

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
1 5 10 15
Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
20 25 30

10

SEQ ID NO: 4

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Ser Gln Pro Ser
1 5 10 15
Pro Ile Asn Ser Thr His Ser Ser Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys
20 25 30

SEQ ID NO: 5

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

5 Texto libre de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 1 Forma truncada o fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana HER2

SEQ ID NO: 2 Epítipo de una forma truncada de la proteína humana HER2

10

SEQ ID NO: 3 Epítipo de una forma truncada de la proteína humana HER2

SEQ ID NO: 4 Péptido sintético derivado de un epítipo de una forma truncada de la proteína humana HER2

15

SEQ ID NO: 5 Péptido sintético derivado de un epítipo de una forma truncada de la proteína humana HER2

Lista de secuencias

20 <110> Fundació Privada Institut de Recerca Hospital Universitari Vall Hebron/ Fundació Privada Institut d'Investigació Oncològica de Vall Hebron (VHIO)/ Fundació Privada Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats

<120> Método para diagnosticar cánceres que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas

25

<130> 134353

<150> P200801652

<151> 08-06-2008

30

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

35

<211> 645

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

40

<223> Forma truncada o fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana HER2

<400> 1

ES 2 528 132 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 528 132 T3

Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu
 145 150 155 160
 Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu
 165 170 175
 Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro
 180 185 190
 Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly
 195 200 205
 Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser
 210 215 220
 Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
 225 230 235 240
 Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu
 245 250 255
 Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly
 260 265 270
 Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg
 275 280 285
 Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu
 290 295 300
 Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu
 305 310 315 320
 Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile
 325 330 335
 Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp
 340 345 350
 Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg
 355 360 365
 Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu
 370 375 380
 Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu
 385 390 395 400

ES 2 528 132 T3

Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro
 405 410 415

Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met
 420 425 430

Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp
 435 440 445

Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro
 450 455 460

Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro
 485 490 495

Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser
 500 505 510

Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu
 515 520 525

Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu
 530 535 540

Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Ala
 545 550 555 560

Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala
 565 570 575

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

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

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

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

Leu Asp Val Pro Val
 645

<210> 2
 <211> 42

ES 2 528 132 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
5 <223> Epítipo de una forma truncada de la proteína humana HER2

<400> 2

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

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

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

10

<210> 3
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

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

<400> 3

20

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

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

25

<210> 4
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Péptido sintético derivado de un epítipo de una forma truncada de la proteína humana HER2

<400> 4

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

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

35

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> Péptido sintético derivado de un epítipo de una forma truncada de la proteína humana HER2

<400> 5

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

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce un epítopo de una forma truncada del receptor HER2 definida por SEQ ID NO: 1, estando dicho epítopo definido por una secuencia incluida en SEQ ID NO: 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es adecuado para distinguir la proteína de SEQ ID NO: 1 del receptor HER2.
- 10 2. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que dicho epítopo es uno incluido en SEQ ID NO: 3.
- 15 3. Anticuerpo o fragmento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es adecuado para distinguir la proteína de SEQ ID NO: 1 de la forma truncada 648-CTF/p95 del receptor HER2.
- 20 4. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 2 ó 3, en el que la distinción puede visualizarse mediante una o más de inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica en células cultivadas e inmunohistoquímica en muestras de pacientes.
- 25 5. Anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo policlonal.
- 30 6. Anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.
- 35 7. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 6, producido por la línea celular de hibridoma depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen - DSMZ" con número de registro DSM ACC2904 o la línea celular de hibridoma depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen - DSMZ" con número de registro DSM ACC2980.
- 40 8. Anticuerpo o fragmento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento es uno seleccionado del grupo formado por F(ab), F(ab') y Fv.
- 45 9. Hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 6 ó 7.
- 50 10. Péptido que consiste en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, que está opcionalmente conjugado con un inmunógeno, para su uso en un método para producir un anticuerpo según una o más de las reivindicaciones 1 ó 2, método que implica la inmunización con dicho péptido.
- 55 11. Método para obtener un anticuerpo monoclonal, en el que la línea celular de hibridoma según la reivindicación 9 se hace crecer en un medio de cultivo adecuado y el anticuerpo monoclonal se recupera de este medio.
- 60 12. Método de diagnóstico de cáncer, que comprende la detección de la presencia de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 en una muestra de paciente, en el que la detección se lleva a cabo con medios seleccionados independientemente del grupo que comprende:
 - 50 (i) detección a través de migración diferencial de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1, en relación con una forma completa de dicho receptor HER2; y
 - (ii) detección mediante la unión con uno o más anticuerpos según una o más de las reivindicaciones 1 a 11.
- 65 13. Método según la reivindicación 12, que es un método de pronóstico que permite el pronóstico de la evolución del crecimiento tumoral y/o metástasis.
- 60 14. Uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el diagnóstico y la determinación del pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2.
- 65 15. Agente para el diagnóstico y la determinación del pronóstico en muestras aisladas de cánceres del tipo que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas, que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 65 16. Agente para el diagnóstico según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se dispone sobre un soporte sólido.

- 5 17. Kit para el diagnóstico y la determinación del pronóstico en muestras aisladas de cánceres del tipo que expresan el receptor HER2 o sus variantes truncadas, que comprende el anticuerpo o un fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para detectar la presencia de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la SEQ ID NO: 1 en la muestra.
18. Kit para el diagnóstico y la determinación del pronóstico según la reivindicación 17, en el que los medios de detección comprenden al menos un agente según las reivindicaciones 15 ó 16.
- 10 19. Kit para el diagnóstico y la determinación del pronóstico según la reivindicación 17, en el que los medios de detección consisten en la detección mediante migración diferencial de la forma truncada del receptor HER2 de SEQ ID NO: 1, en relación con la forma completa de dicho receptor HER2.
- 15 20. Anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones 1 a 9, para uso terapéutico.
21. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 20, para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres en los que se expresa al menos la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1.
- 20 22. Anticuerpo o fragmento según la reivindicación 21, para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres de mama en mamíferos, incluyendo seres humanos.
- 25 23. Anticuerpo o fragmento según una o más de las reivindicaciones 21, para su uso en el tratamiento o la prevención de cánceres seleccionados del grupo que comprende cáncer de pulmón, páncreas, colon, estómago, próstata, cabeza y cuello, piel, riñón, testículo, tiroides, vejiga urinaria, útero, vulva, endometrio, ovario, esófago, boca, glándula salival, laringe, peritoneo, región nasofaríngea, trompas de Falopio, tumores de Wilms, así como linfomas, sarcomas de Swing, sarcoma sinovial, meduloblastomas, tumores trofoblásticos, gliomas, glioblastomas, colangiocarcinomas, colesteatoma, condrosarcoma, ependimoma, neurilemomas, neuromas, rabdomiosarcomas.
- 30 24. Uso de un anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en el que al menos se expresa la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID NO: 1.
- 35 25. Composición farmacéutica para el tratamiento de cánceres en la que al menos se expresa la forma truncada del receptor HER2 que contiene la SEQ ID NO: 1, caracterizada porque comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

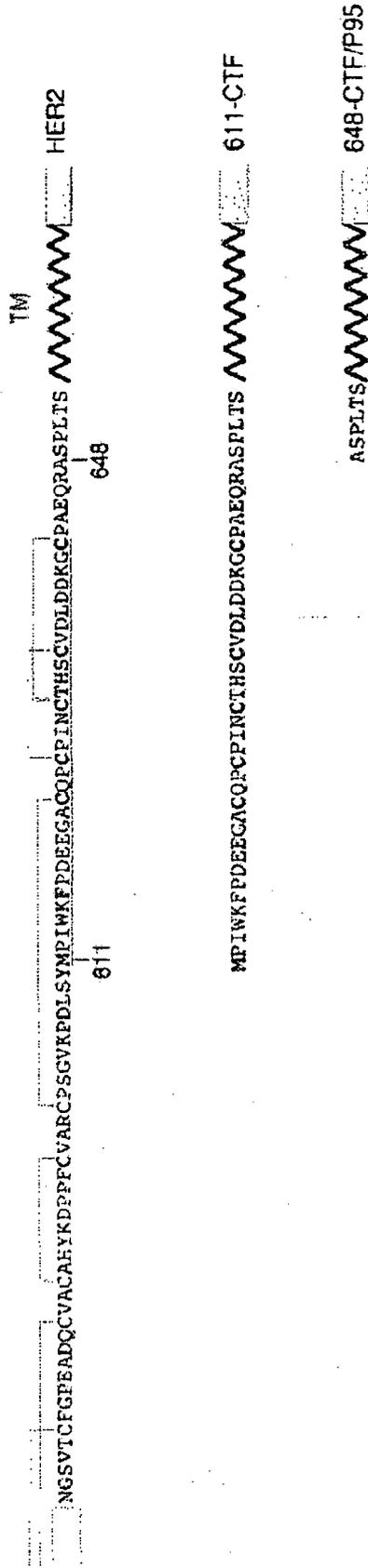


FIG. 1

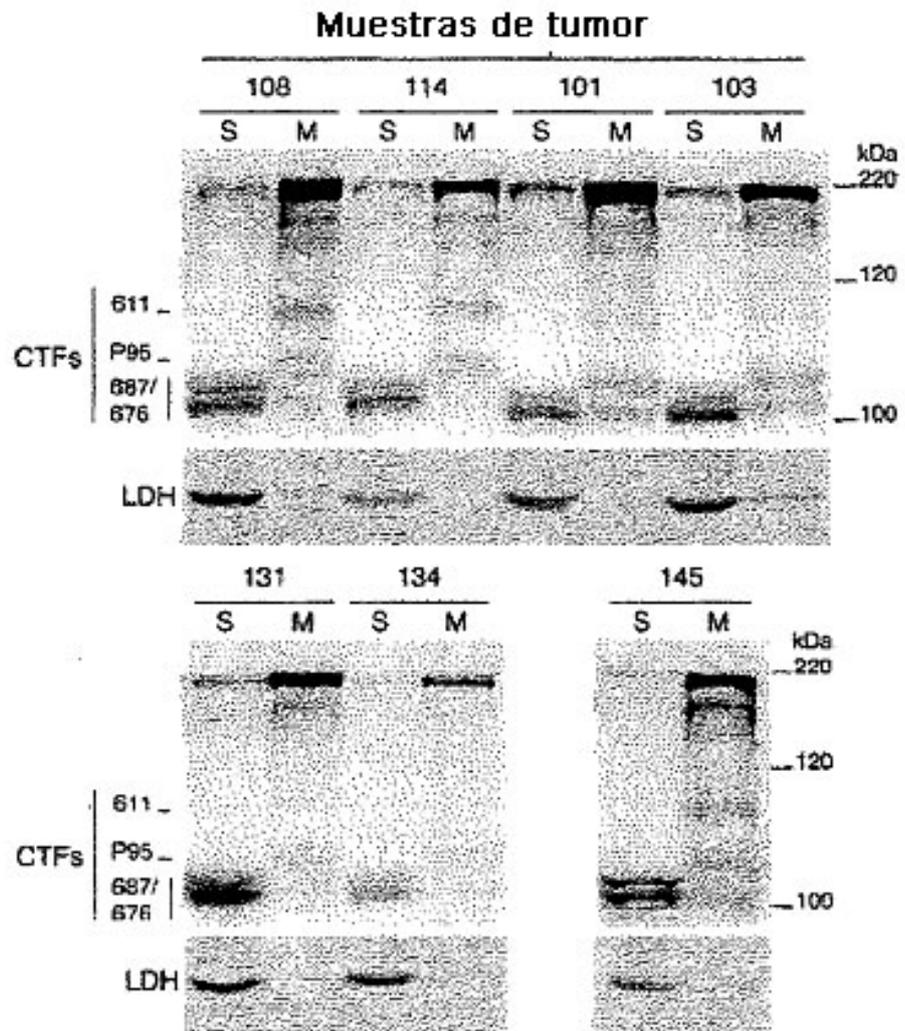


FIG. 2

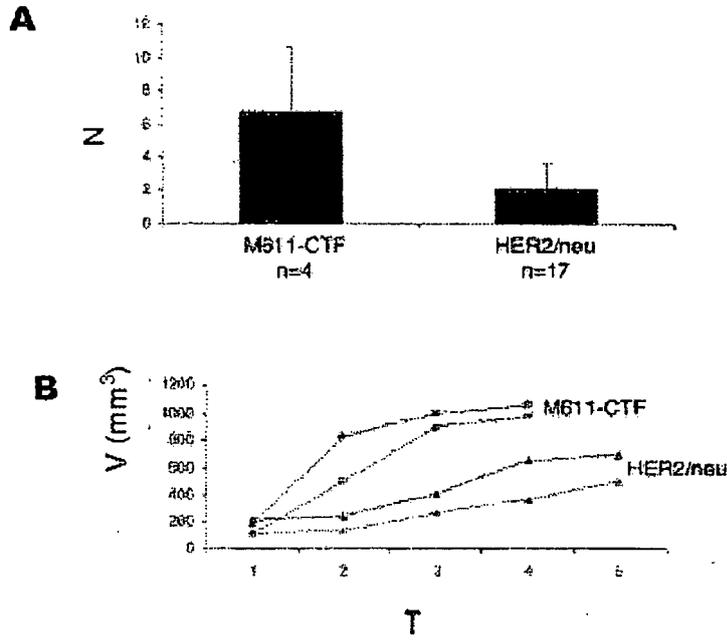


FIG. 3

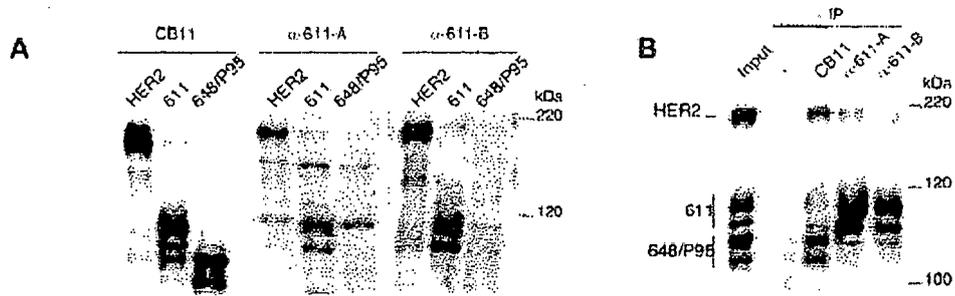


FIG. 4

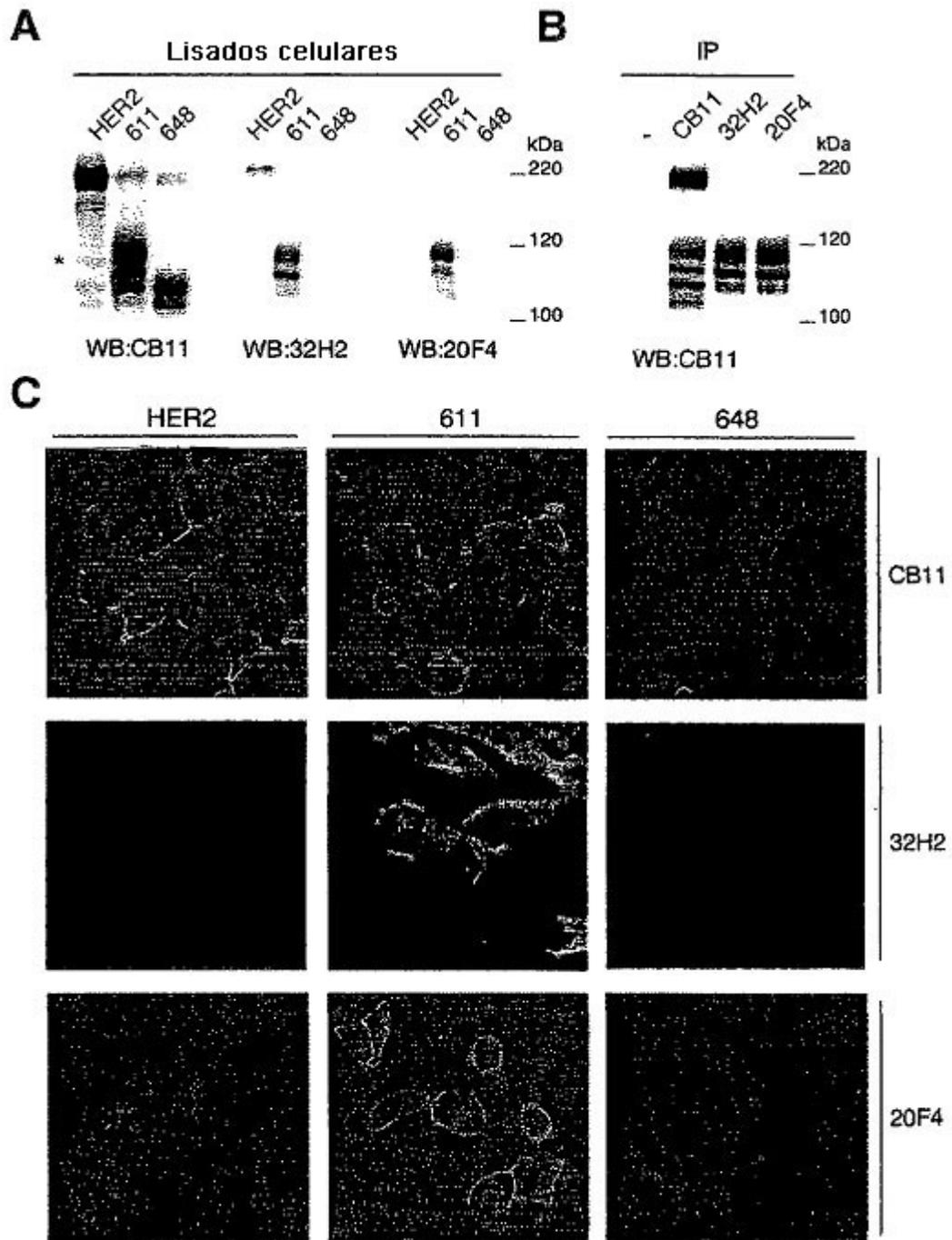


FIG. 5

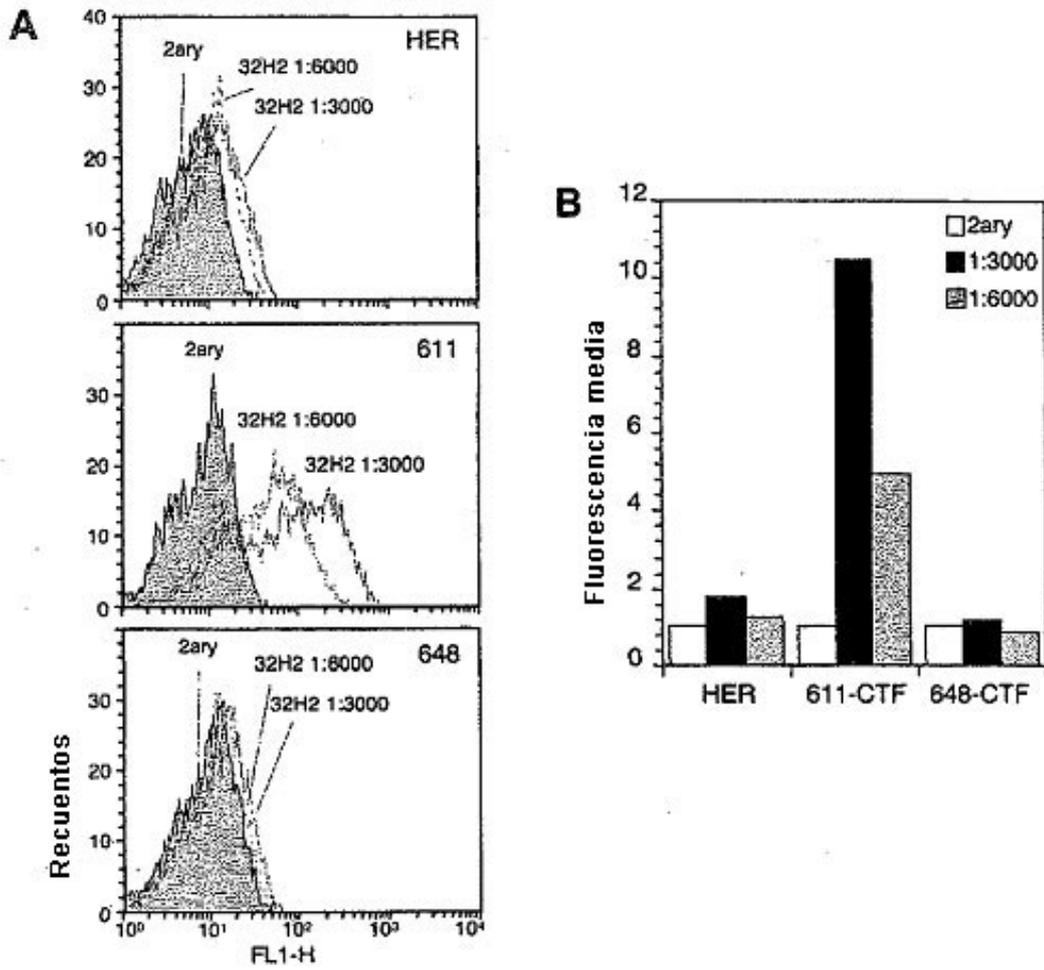


FIG. 6

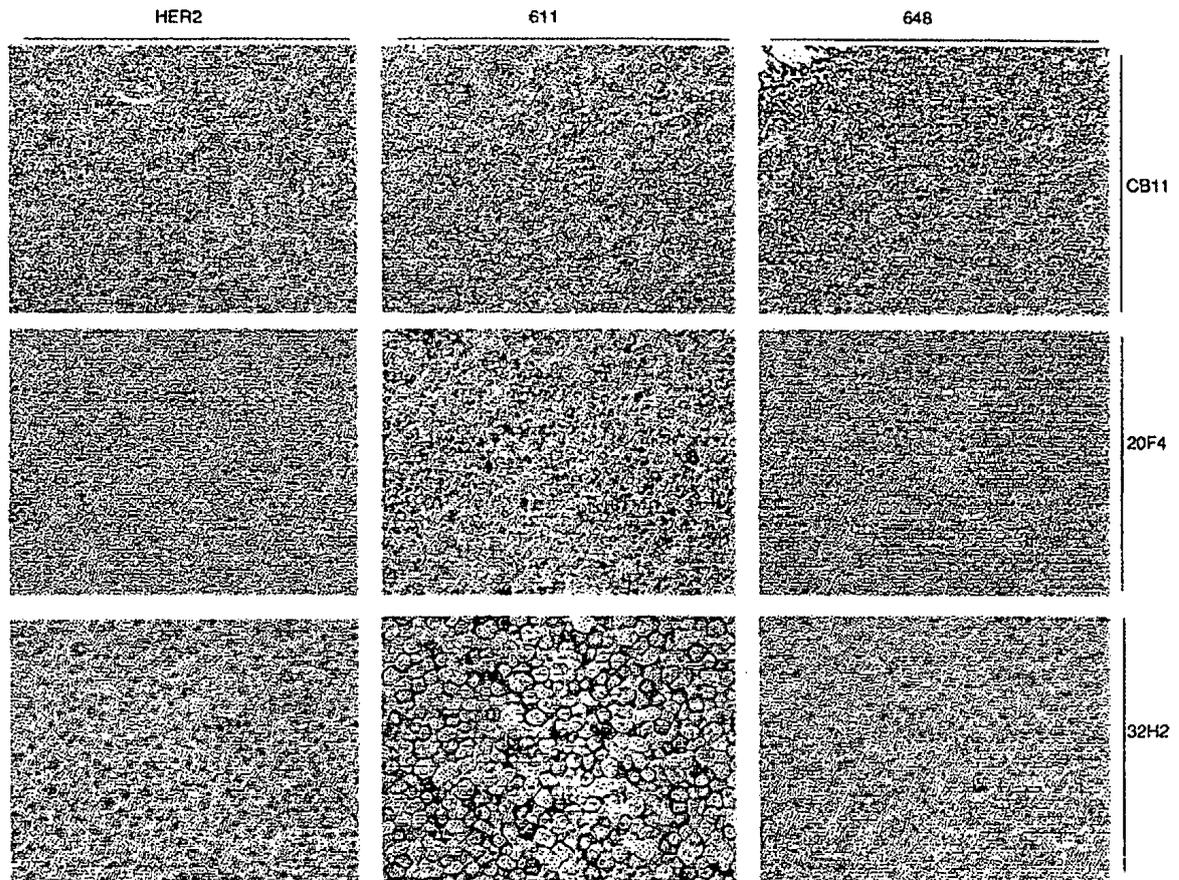


FIG. 7

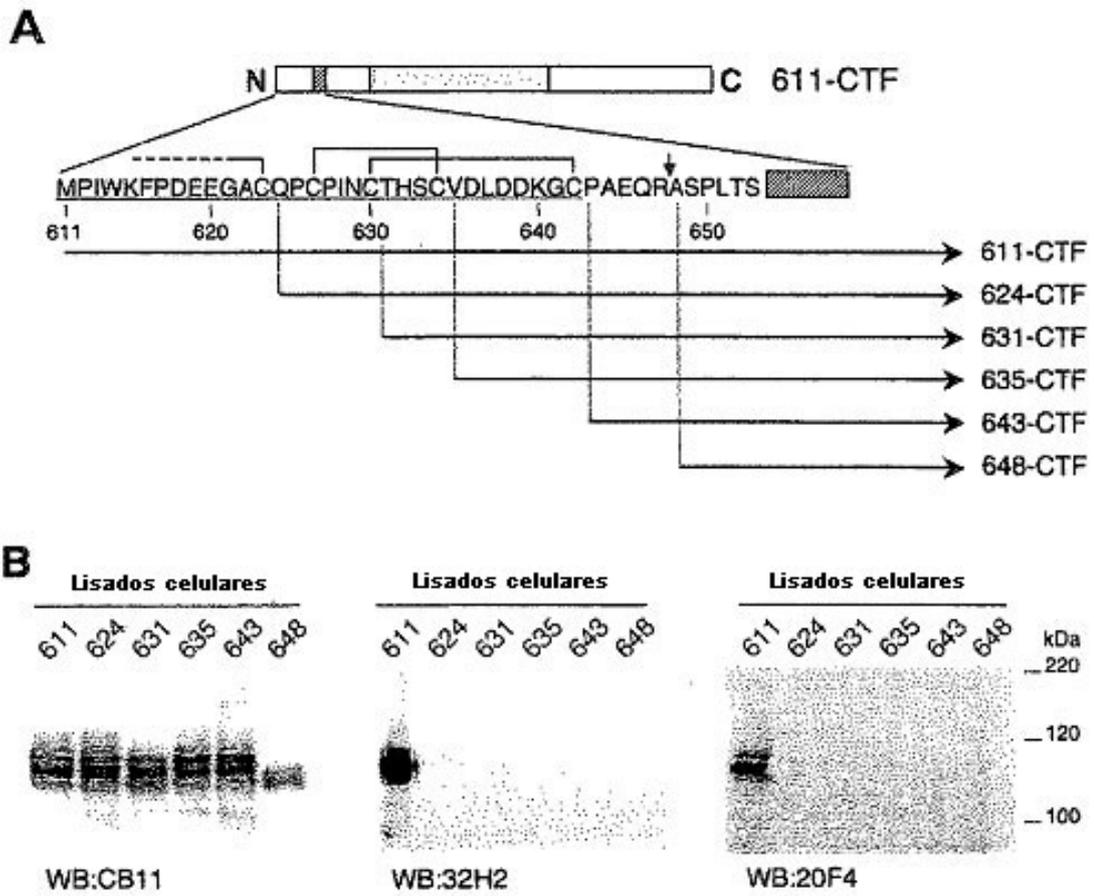


FIG. 8

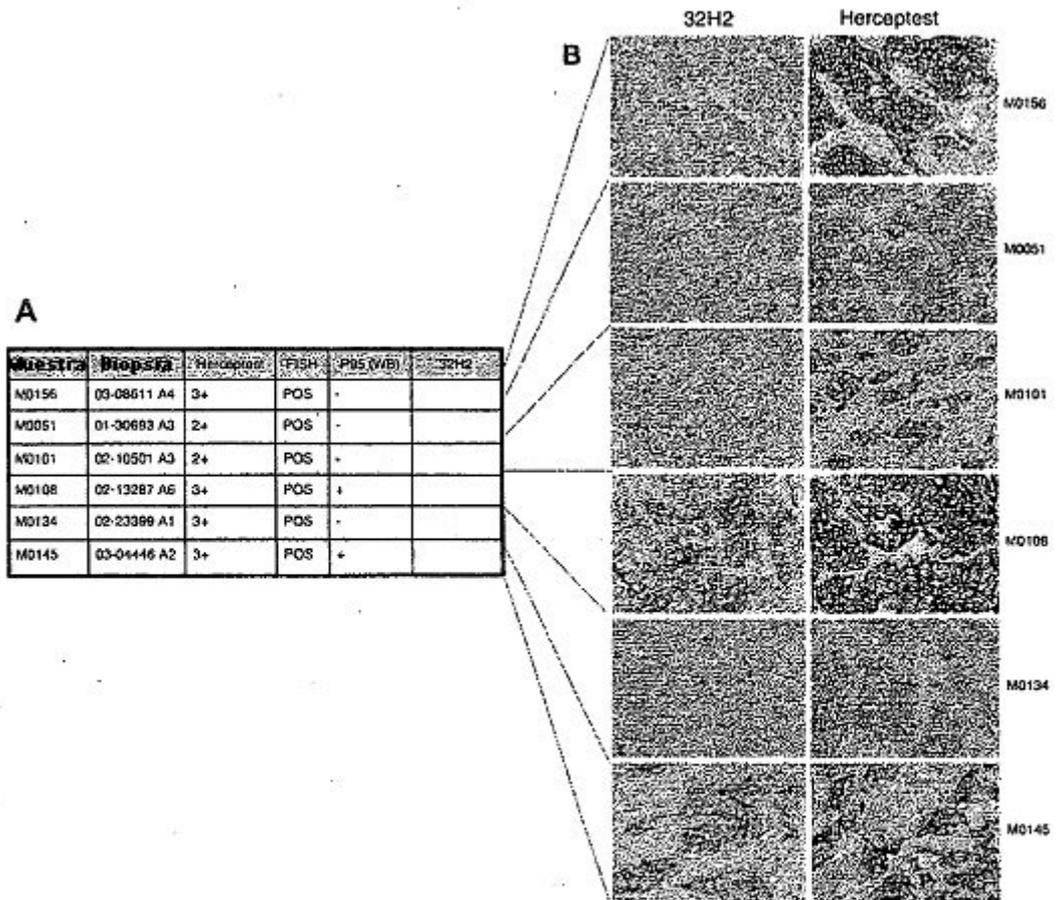


FIG. 9