

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 627**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2010** **E 10193969 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2360187**

54 Título: **Anticuerpos frente a variante truncada CTF-611 de HER2**

30 Prioridad:

07.12.2009 EP 09380183

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

06.09.2016

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE
RECERCA I ESTUDIS AVANÇANTS (50.0%)**

Passeig Lluís Companys 23

08010 Barcelona, ES y

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
ONCOLÒGICA DE VALL-HEBRON (50.0%)**

72 Inventor/es:

ARRIBAS LÓPEZ, JOAQUÍN;

PEDERSEN, KIM;

ANGELLINI, PIER-DAVIDE;

PARRA PALAU, JOSEP LLUÍS y

BASELGA TORRES, JOSÉ

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 581 627 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

Anticuerpos frente a variante truncada CTF-611 de HER2

- 5 La presente invención se refiere generalmente a un diagnóstico en muestras aisladas de cánceres que expresan la variante truncada CTF-611 del 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 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).

- 25 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 epítomo. 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.

- 40 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 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 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 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 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 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 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.

El documento de Pedersen *et al.*, "A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis", Molecular and Cellular Biology, 2009, vol. (12), págs. 3319-3331, describe la relevancia funcional de la variante truncada CTF-611 del receptor HER2. Se muestra que la presencia de CTF-611 conduce al aumento de la expresión de muchos genes que están implicados causalmente en metástasis, tales como MMP1, ANGPTL4, MET e IL11, y de genes que contribuyen a diversos aspectos del desarrollo de tumores malignos, tales como CD44, BCL2A1, ADAM9, PLAUR y EPHA1. *In vivo*, la expresión de CTF-611 en la glándula mamaria de ratón conduce al desarrollo de tumores agresivos, lo que además conduce a metástasis pulmonar con alta frecuencia.

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 permitan 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. En vista de estudios anteriores, es necesario distinguir la variante truncada CTF-611 del receptor HER2 de la longitud completa y otras versiones truncadas, tales como p95-HER2, ya que CTF-611 está implicada en el desarrollo de tumores más agresivos con mayor tendencia a metastatizar en comparación con otras formas del receptor HER2.

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

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce un epítipo de una forma truncada de receptor HER2, definiéndose dicho epítipo por una secuencia incluida en SEQ ID NO: 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo puede discriminar entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y CTF-616 representada por SEQ ID NO: 7, entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y el receptor HER2, entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y la forma truncada de receptor HER2 648-CTF/p95 y entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y CTF-613 representada por SEQ ID NO: 6.

Se definen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones

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 representada por SEQ ID NO: 1.

Se ha usado esta secuencia para desarrollar varias herramientas para detectar su presencia en muestras de tejido y preferiblemente para distinguirla de HER2 de longitud completa y p95-HER2, proporcionando así un nuevo y sólido conjunto de diagnóstico que también es aplicable en la rutina clínica.

5 La presente invención, tal como se proporciona en las reivindicaciones, proporciona por tanto nuevos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que reconocen esta forma truncada CTF-611 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.

15 Los anticuerpos proporcionados por la presente invención detectan específicamente CTF-611, representada por SEQ ID NO: 1, y pueden distinguir CTF-611 de CTF-616 y distinguir CTF-611 de CTF-613. Los anticuerpos proporcionados por la presente invención, sin embargo, no se unen a p95-HER2 ni HER2 de longitud completa.

20 La presente invención también es útil en métodos 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.

25 El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención también es útil en el diagnóstico y la determinación del pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2.

La presente divulgación se refiere además a 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.

30 La presente divulgación también se refiere a 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.

35 La invención también proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo tal como se define en las reivindicaciones para su uso en terapia o en la fabricación de un medicamento. En particular, 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.

40 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.

45 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 define en las reivindicaciones y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

50 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.

55 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).

60 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.

65 Figura 4: Inmunotransferencia de tipo Western: Se analizaron lisados celulares de células MCF7 transfectadas de

manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2 (carriles de la izquierda), 611-CTF (carriles centrales) y 648-CTF (carriles de la derecha) con CB11 (A), un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra el dominio intracelular de HER2, con el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 (B), o con el anticuerpo monoclonal 226H4e8d10. Se muestran sólo los resultados correspondientes a 214D8c12h4. Se obtuvieron resultados similares con 226H4e8d10.

Figura 5: Inmunoprecipitación: Se incubó una mezcla 1:1:1 de lisados celulares de células MCF7 transfectadas de manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2, 611-CTF y 648-CTF con los anticuerpos CB11, trastuzumab (un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de HER2 que no reconoce 611-CTF), 214D8c12h4 o 226H4e8d10. Se recogieron los complejos inmunitarios con la proteína A, se lavaron y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western con CB11. Se muestran sólo los resultados correspondientes a 214D8c12h4. Se obtuvieron resultados similares con 226H4e8d10.

Figura 6: Mapeo de epítomos: A: Esquema que ilustra CTF-611, CTF-613 y CTF-616 B: Inmunotransferencia de tipo Western: Se analizaron lisados de células que expresan CTF-611, CTF-613 y CTF-616 con CB11 (izquierda), un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra el dominio intracelular de HER2, con el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 (zona central), o con el anticuerpo monoclonal 226H4e8d10 (derecha).

Figura 7: Inmunofluorescencia: Se analizaron células MCF7 transfectadas de manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2 (imágenes en la columna de la izquierda), 611-CTF (imágenes en la columna central) y 648-CTF (imágenes en la columna de la derecha) mediante inmunofluorescencia indirecta con CB11, un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra el dominio intracelular de HER2, con el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4, o con el anticuerpo monoclonal 226H4e8d10.

Figura 8: Inmunohistoquímica: Se analizaron células MCF7 transfectadas de manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2, 611-CTF y 648-CTF mediante inmunohistoquímica con CB11 (imágenes en la columna de la izquierda), un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra el dominio intracelular de HER2, o el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 (imágenes en la columna de la derecha) o los anticuerpos monoclonales 226H4. Se muestran sólo los resultados correspondientes a 214D8. Se obtuvieron resultados similares con 226D8.

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 7 más adelante se proporcionan experimentos adicionales que proporcionan 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.

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

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

5 Los inventores pudieron producir anticuerpos monoclonales frente a CTF-611. Estos anticuerpos reconocen un epítipo 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 epítipo que está incluido en o está definido por MPIWKFPDEEGAS (SEQ. ID NO: 5).

10 En el contexto de la presente invención, se entiende que epítipo 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).

15 Los anticuerpos según la presente invención pueden reconocer CTF-611 y distinguir CTF-611 de CTF-616 (SEQ ID NO: 7), y distinguir CTF-611 de CTF-613 (SEQ ID NO: 6).

20 Los anticuerpos de la presente invención pueden distinguir la proteína de SEQ ID NO: 1 del receptor HER2. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden distinguir la proteína de SEQ ID NO: 1 de la forma troncada 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.

25 El anticuerpo puede ser policlonal y monoclonal.

30 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.

35 Pueden producirse anticuerpos policlonales 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.

40 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.

45 Se dan a conocer en el presente documento anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma depositadas en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH - DSMZ" con números de registro DSM ACC3016 (214D8c12h4) y DSM ACC3017 (226H4e8d10) según el Tratado de Budapest.

También se dan a conocer anticuerpos monoclonales que son al menos equivalentes desde el punto de vista funcional a anticuerpos monoclonales producidos por estas líneas celulares de hibridoma.

50 Al menos equivalentes desde el punto de vista funcional son aquellos anticuerpos que pueden discriminar entre CTF-611 y CTF-616, preferiblemente CTF-613, y entre CTF-611 y HER2 igualmente bien o incluso mejor.

Los anticuerpos útiles también incluyen anticuerpos humanizados y humanos.

55 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 troncada del receptor HER2 y por tanto para permitir su detección en una muestra.

60 El ejemplo 3 muestra anticuerpos monoclonales específicos. Evidentemente, la invención, que se define en las reivindicaciones, se extiende a otros anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra el epítipo de la forma troncada CTF-611 que se define por las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 que pueden discriminar entre CTF-611 y CTF-616, y también CTF-613, 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 que pueden discriminar

entre CTF-611 y CTF-616, y CTF-613 tal como se define en las reivindicaciones.

Métodos de diagnóstico

5 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
10 detección mediante unión con anticuerpos específicos de la forma truncada del receptor HER2 que contiene la SEQ ID NO: 1.

15 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.

20 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.

25 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 comprende un nuevo dominio extracelular, un fragmento transmembrana y un dominio citosólico. El fragmento
30 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.

35 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 define en las reivindicaciones. En una realización particular, el método de diagnóstico según la invención comprende la detección del epítipo definido por SEQ ID NO: 3.

40 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 cuantificable, con la que detectar la presencia de la forma truncada del receptor HER2 que consiste en la secuencia
45 SEQ ID NO: 1 en una muestra.

50 De la misma manera, se contempla el agente de diagnóstico que contiene al menos los anticuerpos que van a adherirse a un soporte sólido, directa o indirectamente por medio de un brazo espaciador. Un agente de este tipo permite 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).

55 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 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.

60 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 instrucciones detalladas, que ayudan al médico en la evaluación del diagnóstico. Este kit también puede comprender
65 un medio para llevar a cabo un ensayo inmunohistoquímico semicuantitativo para la determinación de HER2 (tal como Herceptest™).

Por tanto, la divulgación incluye un kit para el diagnóstico y la determinación del pronóstico, que comprende al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo, pudiendo dicho anticuerpo o fragmento reconocer el epítipo definido por SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5, pero no pudiendo reconocer SEQ ID NO: 6, ni SEQ ID NO: 7, 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.

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 dado a conocer en 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 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*.

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.

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, pero no reconoce SEQ ID NO: 6 ni SEQ ID NO: 7. 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™.

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.

Aunque no se especifica, todos los términos técnicos y científicos usados en la memoria descriptiva tienen el significado que un experto en la técnica les asignaría. En la práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. 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 puede 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 que se define en las reivindicaciones.

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

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.

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.

Inmunotransferencia de tipo Western. Se lisaron las células que expresaban las diferentes isoformas de HER2 en tampón RIPA modificado (NaH_2PO_4 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 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$ y Na_3VO_4 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).

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.

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 NaN_3 al 0,02%, y para la preparación se usó Vectashield con DAPI (Vector laboratories). Se usaron anticuerpos a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Inmunohistoquímica. Se lavaron células MCF7 que expresaban HER2, 611-CTF o 648-CTF 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:

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.

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

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

AUTOSTAINER más Link DAKO

Kit Envision Flex + ratón, pH alto (Link):

Bloqueo de peroxidasa Envision Flex SM801.

Envision Flex/ HRP SM 802.

Envision Flex DAB+cromógeno DM 807.

Tampón de sustrato Envision Flex SM 803.

Tampón de lavado Envision Flex 10x DM 811.

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.

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

5 Lavar con tampón de lavado.

- 214D8c12h4 o 226H4e8d10 a 0,2 µg/ml, 2 horas.

10

- Lavar con tampón de lavado.
- Secundario (Flex HRP, Flex+ratón/conejo) 20 min.

15

- Lavar con tampón de lavado.

15

- DAB 5 min.

- Lavar con tampón de lavado.

20

- Hematoxilina.

- Lavar con agua destilada.

3. Deshidratar y estabilizar con medio de preparación

25 3.1 Lavar gradualmente con concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 95%, 2 min cada lavado).

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

30

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

3.4 Realizar preparación con DPX.

Ratones transgénicos

35

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 Terapia 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).

45

Histología y preparaciones completas

50

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.

55

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

60

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.

65

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.

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

Usando el péptido que tiene la secuencia SEQ ID NO: 4, se obtuvieron anticuerpos monoclonales. 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).

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.

Se seleccionaron el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 producido por la línea celular de hibridoma con número de registro DSM ACC3016 y el anticuerpo monoclonal 226H4e8d10 producido por la línea celular de hibridoma con número de registro DSM ACC3017. Los resultados obtenidos con este anticuerpo se muestran en la figura 4 y la figura 5.

Se llevaron a cabo SDS-PAGE y la posterior transferencia de tipo Western con lisados celulares de células MCF7 transfectadas de manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2, 611-CTF y 648-CTF. Éstos se analizaron con CB11, un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra el dominio intracelular de HER2, o con el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 o el 226H4e8d10. El anticuerpo CB11 reconoce HER2, 611-CTF y 648-CTF (figura 4). Los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 reconocen 611-CTF y HER2 de longitud completa cuando se analizan por inmunotransferencia de tipo Western. Ninguno de los anticuerpos monoclonales reconoce 648-CTF, que carece del epítipo. Se muestran sólo los resultados correspondientes a 214D8. Se obtuvieron resultados similares con 226D8.

De hecho, CTF-611 apareció como dos fragmentos de peso molecular similar. Tal como puede deducirse de 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.

Además, se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación con los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 en comparación con el anticuerpo CB11 (que reconoce el dominio citosólico de los receptores) y el anticuerpo Trastuzumab (que reconoce un epítipo en el dominio extracelular de HER2 que es diferente del epítipo reconocido por los anticuerpos según la presente invención y no reconoce CTF-611). Se incubó una mezcla 1:1:1 de lisados celulares de células MCF7 transfectadas de manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2, 611-CTF y 648-CTF con los anticuerpos CB11, trastuzumab, 214D8c12h4 o 226H4e8d10. Se recogieron los complejos inmunitarios con la proteína A, se lavaron y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western con CB11 (figura 5). Se muestran sólo los resultados correspondientes a 214D8c12h4. Se obtuvieron resultados similares con 226H4e8d10.

Mientras que CB11 inmunoprecipita especies de HER2 a partir de los tres constructos de ADNc, trastuzumab inmunoprecipita sólo HER2 de longitud completa. 214D8c12h4 y 226H4e8d10 se unen preferentemente a CTF-611, lo que indica que estos anticuerpos son específicos para este fragmento de HER2 y que el epítipo que reconocen está enmascarado en la molécula de longitud completa.

En el carril correspondiente a inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 (figura 5, carril de la derecha), sólo pueden distinguirse las bandas de la forma glicosilada y no glicosilada de la forma truncada CTF-611. Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo monoclonal 226H4e8d10. Por tanto, los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 pueden inmunoprecipitar CTF-611 pero no HER2 de longitud completa ni CTF-648. A partir de esto puede concluirse que los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 reconocen específicamente CTF-611 y no muestran ninguna reactividad con HER2 de longitud completa ni CTF-648. Por consiguiente, 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 una secuencia de CTF-611 larga de 32 aminoácidos N-terminal confirma la existencia de epítipo(s) enmascarado(s) en HER2 de longitud completa pero expuesto(s) en CTF-611. Estos epítipos están enmascarados tanto en la molécula solubilizada como en células intactas.

5 Ejemplo 3: Caracterización de los epítipos reconocidos por los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 contra el extremo N-terminal de CTF-611

10 La figura 6A muestra un esquema que representa la secuencia primaria de la región yuxtamembrana de CTF-611. Se indican los extremos N y C-terminales de la molécula. Los dominios transmembrana y cinasa se indican con un recuadro rayado y gris, respectivamente. Se indica la secuencia de los constructos de delección CTF-613 y CTF-616.

15 Con el fin de caracterizar el epítipo reconocido por los anticuerpos 214D8c12h4 y 226H4e8d10, se usaron células transfectadas con constructos de ADNc que expresan CTF-611, CTF-613 o CTF-616. Se analizaron los lisados celulares mediante inmunotransferencia de tipo Western con CB11 (figura 6B, panel de la izquierda), un anticuerpo contra el dominio citoplasmático de HER2, con 214D8c12h4 (figura 6B, panel central) o con 226H4e8d10 (figura 6B, panel de la derecha).

20 Conclusiones. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western de los lisados de células que expresan CTF-611, CTF-613 y CTF-616 muestra que los anticuerpos 214D8c12h4 y 226H4e8d10 reconocen diferentes epítipos. El epítipo reconocido por 214D8c12h4 está alterado en el constructo de CTF-613. En contraposición, el epítipo reconocido por 226H4e8d10 está conservado en el mismo constructo.

25 Ejemplo 4: Caracterización de los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 contra el extremo N-terminal de CTF-611 mediante inmunofluorescencia

30 Se analizaron células MCF7 transfectadas de manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2, 611-CTF y 648-CTF mediante inmunofluorescencia indirecta con CB11, un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra el dominio intracelular de HER2, con el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 o con el anticuerpo monoclonal 226H4e8d10 (figura 7).

35 Tal como se esperaba, los anticuerpos CB11 tiñen las tres líneas celulares. Los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 sólo tiñen CTF-611. Este resultado muestra que los anticuerpos 214D8c12h4 y 226H4e8d10 reconocen un epítipo en el constructo de CTF-611 que está enmascarado en las moléculas de longitud completa. Por tanto, estos anticuerpos son herramientas útiles para detectar específicamente la presencia de CTF-611.

40 Ejemplo 5: Caracterización de los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 contra el extremo N-terminal de CTF-611 mediante inmunohistoquímica

45 Se analizaron células MCF7 transfectadas de manera estable con constructos de ADNc que codifican para HER2, CTF-611 y 648-CTF mediante inmunohistoquímica con CB11, un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra el dominio intracelular de HER2, con el anticuerpo monoclonal 214D8c12h4 o con el anticuerpo monoclonal 226H4e8d10. Se muestra el resultado en la figura 8. Se muestran sólo los resultados correspondientes a 214D8c12h4. Se obtuvieron resultados similares con 226H4e8d10.

50 Conclusiones. Tal como se esperaba los anticuerpos CB11 tiñen las tres líneas celulares. Los anticuerpos monoclonales 214D8c12h4 y 226H4e8d10 sólo tiñen CTF-611. Este resultado muestra que los anticuerpos 214D8c12h4 y 226H4e8d10 reconocen un epítipo en el constructo de CTF-611 que está enmascarado en las moléculas de longitud completa. Por tanto, estos anticuerpos son herramientas útiles para detectar específicamente la presencia de CTF-611. 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.

55 Ejemplo 6: Generación de modelos animales para caracterizar el efecto de la expresión de CTF *in vivo*

60 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 CTF-611 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).

65 A las 7 semanas de edad, los niveles de CTF-611 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.

5 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 mamarios 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.

10 Ejemplo 7: La expresión de CTF-611 conduce al desarrollo de tumores mamarios 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:

15 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 mamarios mediante palpación semanalmente.)

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

20 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 CTF-611 fue un número mayor de imágenes mitóticas en los de los ratones TG 611.

25 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).

30 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 CTF-611 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.

35 Secuencias

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 6

Met 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
 Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met
 80 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
 Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu

160 165 170 175
 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

 Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu
 240 245 250 255
 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
 Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile
 320 325 330 335
 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
 Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro
 400 405 410 415
 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
 Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro
 480 485 490 495
 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
 Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala
 560 565 570 575
 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
 Leu Asp Val Pro Val
 640

SEQ ID NO: 7

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

	35	40	45
Leu	Leu	Val	Val
Val	Val	Leu	Gly
Val	Val	Phe	Gly
Ile	Leu	Ile	Lys
Arg			
	50	55	60
Arg	Gln	Gln	Lys
Ile	Arg	Lys	Tyr
Thr	Met	Arg	Arg
Leu	Leu	Gln	Glu
	65	70	75
Thr	Glu	Leu	Val
Glu	Pro	Leu	Thr
Pro	Ser	Gly	Ala
Met	Pro	Asn	Gln
	80	85	90
Ala	Gln	Met	Arg
Ile	Leu	Lys	Glu
Thr	Glu	Leu	Arg
Lys	Val	Lys	Val
	100	105	110
Leu	Gly	Ser	Gly
Ala	Phe	Gly	Thr
Val	Tyr	Lys	Gly
Ile	Trp	Ile	Pro
	115	120	125
Asp	Gly	Glu	Asn
Val	Lys	Ile	Pro
Val	Ala	Ile	Lys
Val	Leu	Arg	Glu
	130	135	140
Asn	Thr	Ser	Pro
Lys	Ala	Asn	Lys
Glu	Ile	Leu	Asp
Glu	Ala	Tyr	Val
	145	150	155
Met	Ala	Gly	Val
Gly	Ser	Pro	Tyr
Val	Ser	Arg	Leu
Leu	Leu	Gly	Ile
Cys			
	160	165	170
Leu	Thr	Ser	Thr
Val	Gln	Leu	Val
Thr	Gln	Leu	Met
Pro	Tyr	Gly	Cys
	180	185	190
Leu	Leu	Asp	His
Val	Arg	Glu	Asn
Arg	Gly	Arg	Leu
Gly	Ser	Gln	Asp
	195	200	205
Leu	Leu	Asn	Trp
Cys	Met	Gln	Ile
Ala	Lys	Gly	Met
Ser	Tyr	Leu	Glu
	210	215	220
Asp	Val	Arg	Leu
Val	His	Arg	Asp
Leu	Ala	Ala	Arg
Asn	Val	Leu	Val
	225	230	235
Lys	Ser	Pro	Asn
His	Val	Lys	Ile
Thr	Asp	Phe	Gly
Leu	Ala	Arg	Leu
	240	245	250
Leu	Asp	Ile	Asp
Glu	Thr	Glu	Tyr
His	Ala	Asp	Gly
Gly	Lys	Val	Pro
	260	265	270
Ile	Lys	Trp	Met
Ala	Leu	Glu	Ser
Ile	Leu	Arg	Arg
Arg	Phe	Thr	His
	275	280	285
Gln	Ser	Asp	Val
Trp	Ser	Tyr	Gly
Val	Thr	Val	Trp
Glu	Leu	Met	Thr
	290	295	300
Phe	Gly	Ala	Lys
Pro	Tyr	Asp	Gly
Ile	Pro	Ala	Arg
Glu	Ile	Pro	Asp
	305	310	315

Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile
 320 325 330 335
 Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys
 340 345 350
 Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg
 355 360 365
 Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala
 370 375 380
 Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp
 385 390 395
 Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly
 400 405 410 415
 Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His
 420 425 430
 Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 435 440 445
 Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro
 450 455 460
 Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly
 465 470 475
 Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu
 480 485 490 495
 Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp
 500 505 510
 Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn
 515 520 525
 Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu
 530 535 540
 Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Ala Lys Thr Leu
 545 550 555
 Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly
 560 565 570 575
 Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro
 580 585 590
 Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr

595 **600** **605**
Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe
610 **615** **620**
Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val
625 **630** **635**
Pro Val
640

Texto libre de la lista de secuencias

- 5 SEQ ID NO: 1 Forma truncada o fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana HER2
- SEQ ID NO: 2 Epítopo de una forma truncada de la proteína humana HER2
- SEQ ID NO: 3 Epítopo de una forma truncada de la proteína humana HER2
- 10 SEQ ID NO: 4 Péptido sintético derivado de un epítopo de una forma truncada de la proteína humana HER2
- SEQ ID NO: 5 Péptido sintético derivado de un epítopo de una forma truncada de la proteína humana HER2
- 15 SEQ ID NO: 6 Fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana CTF-613 de HER2
- SEQ ID NO: 7 Fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana CTF-616 de HER2

Lista de secuencias

- 20 <110> Fundació Privada Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats/ Fundació Privada Institut d'Investigació Oncològica de Vall Hebron (VHIO)
- <120> Anticuerpos frente a variante truncada CTF-611 de HER2
- 25 <130> 145876
- <160> 7
- 30 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 645
- <212> PRT
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <223> Forma truncada o fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana HER2
- 40 <400> 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
 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
 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
 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
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

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

10 <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

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

15

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

<400> 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
    
```

5 <210> 4
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <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
    
```

15 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <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
    
```

25 <210> 6
 <211> 644
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana CTF-613 de HER2

35 <400> 6

```

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

Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser Ala Val Val
 35 40 45
 Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile
 50 55 60
 Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro
 85 90 95
 Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val
 100 105 110
 Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp
 115 120 125
 Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu
 130 135 140
 Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala
 145 150 155 160
 Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly
 165 170 175
 Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr
 180 185 190
 Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser
 195 200 205
 Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr
 210 215 220
 Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val
 225 230 235 240
 Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala
 245 250 255
 Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys
 260 265 270
 Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe
 275 280 285
 Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu
 290 295 300
 Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu Ile
 305 310 315 320
 Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys
 325 330 335
 Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ser
 340 345 350
 Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met
 355 360 365
 Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly
 370 375 380
 Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp
 385 390 395 400

Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln
 405 410 415
 Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val
 420 425 430
 His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu
 435 440 445
 Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu
 450 455 460
 Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly
 465 470 475 480
 Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser
 485 490 495
 Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu
 500 505 510
 Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr
 515 520 525
 Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly
 530 535 540
 Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Ala Lys
 545 550 555 560
 Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe
 565 570 575
 Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
 580 585 590
 Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn
 595 600 605
 Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser
 610 615 620
 Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu
 625 630 635 640
 Asp Val Pro Val

<210> 7
 <211> 641
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Fragmento carboxilo terminal (CTF) de la proteína humana CTF-616 de HER2

10

<400> 7
 Met Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 1 5 10 15
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln
 20 25 30
 Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser Ala Val Val Gly Ile Leu
 35 40 45
 Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile Leu Ile Lys Arg Arg
 50 55 60

Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr
 65 70 80
 Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala Met Pro Asn Gln Ala
 85 95
 Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg Lys Val Lys Val Leu
 100 110
 Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Ile Trp Ile Pro Asp
 115 125
 Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn
 130 140
 Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met
 145 155 160
 Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu
 165 175
 Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met Pro Tyr Gly Cys Leu
 180 185 190
 Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu Gly Ser Gln Asp Leu
 195 200 205
 Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met Ser Tyr Leu Glu Asp
 210 215 220
 Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys
 225 230 235 240
 Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu
 245 250 255
 Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly Gly Lys Val Pro Ile
 260 265 270
 Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg Arg Phe Thr His Gln
 275 280 285
 Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe
 290 295 300
 Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg Glu Ile Pro Asp Leu
 305 310 315 320
 Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp
 325 330 335
 Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ser Glu Cys Arg
 340 345 350
 Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp
 355 360 365
 Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp Leu Gly Pro Ala Ser
 370 375 380
 Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Asp Asp Met
 385 390 395 400
 Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe
 405 410 415
 Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala Gly Gly Met Val His His Arg
 420 425 430

His Arg Ser Ser Ser Thr Arg Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly
 435 440 445
 Leu Glu Pro Ser Glu Glu Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser
 450 455 460
 Glu Gly Ala Gly Ser Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala
 465 470 475 480
 Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln
 485 490 495
 Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly
 500 505 510
 Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln
 515 520 525
 Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
 530 535 540
 Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Ala Lys Thr Leu Ser
 545 550 555 560
 pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly Gly Ala
 565 570 575
 Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala Ala Pro Gln
 580 585 590
 Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr
 595 600 605
 Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro Pro Ser Thr Phe Lys
 610 615 620
 Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Gly Leu Asp Val Pro
 625 630 635 640
 val

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce un epítipo de una forma truncada del receptor HER2, estando dicho epítipo definido por una secuencia incluida en SEQ ID NO: 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo puede discriminar entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y CTF-616 representada por SEQ ID NO: 7, entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y el receptor HER2, entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y la forma truncada del receptor HER2 648-CTF/p95 y entre la variante truncada de HER2 CTF-611 representada por SEQ ID NO: 1 y CTF-613 representada por SEQ ID NO: 6.
2. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que dicho epítipo es uno incluido en SEQ ID NO: 3.
3. Anticuerpo o fragmento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la distinción puede visualizarse mediante uno o más de inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica en células cultivadas e inmunohistoquímica en muestras de pacientes.
4. Anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo policlonal.
5. Anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.
6. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 5, producido por la línea celular de hibridoma depositada en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen - DSMZ" con el número de registro DSM ACC3016.
7. Anticuerpo o fragmento según una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento se selecciona del grupo formado por F(ab), F(ab') y Fv.
8. Hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal según la reivindicación 5 ó 6.
9. Método para producir un anticuerpo según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, que implica la inmunización con un péptido que consiste en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, que se conjuga opcionalmente con un inmunógeno.
10. Método según la reivindicación 9 para obtener un anticuerpo monoclonal, en el que la línea celular de hibridoma según la reivindicación 8 se hace crecer en un medio de cultivo adecuado y el anticuerpo monoclonal se recupera de este medio.
11. 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, usando uno o más anticuerpos según una o más de las reivindicaciones 1 a 7.
12. Método según la reivindicación 11, que es un método de pronóstico que permite el pronóstico de la progresión del crecimiento tumoral y/o metástasis.
13. Uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el diagnóstico y la determinación del pronóstico en muestras aisladas de cánceres en los que se expresa el receptor HER2.
14. Agente para el diagnóstico y la determinación del 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 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
15. Agente para el diagnóstico según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se dispone sobre un soporte sólido.
16. 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, en el que los medios de detección comprenden al menos un agente según las reivindicaciones 14 ó 15.
17. Anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en terapia.
18. Anticuerpo o fragmento para el uso según la reivindicación 17, para el uso en el tratamiento o la prevención de cánceres en los que al menos se expresa la forma truncada del receptor HER2 que consiste en SEQ ID

NO: 1.

- 5
19. Anticuerpo o fragmento para el uso según la reivindicación 17 ó 18, en el que dicho uso es en el tratamiento o la prevención de cánceres de mama en mamíferos, incluyendo seres humanos.
- 10
20. Anticuerpo o fragmento para el uso según la reivindicación 17 ó 18, en el que dicho uso es 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.
- 15
21. Uso de un anticuerpo o fragmento del mismo según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 20
22. Composición farmacéutica para su uso en 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 7 y al menos un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Muestras de tumor

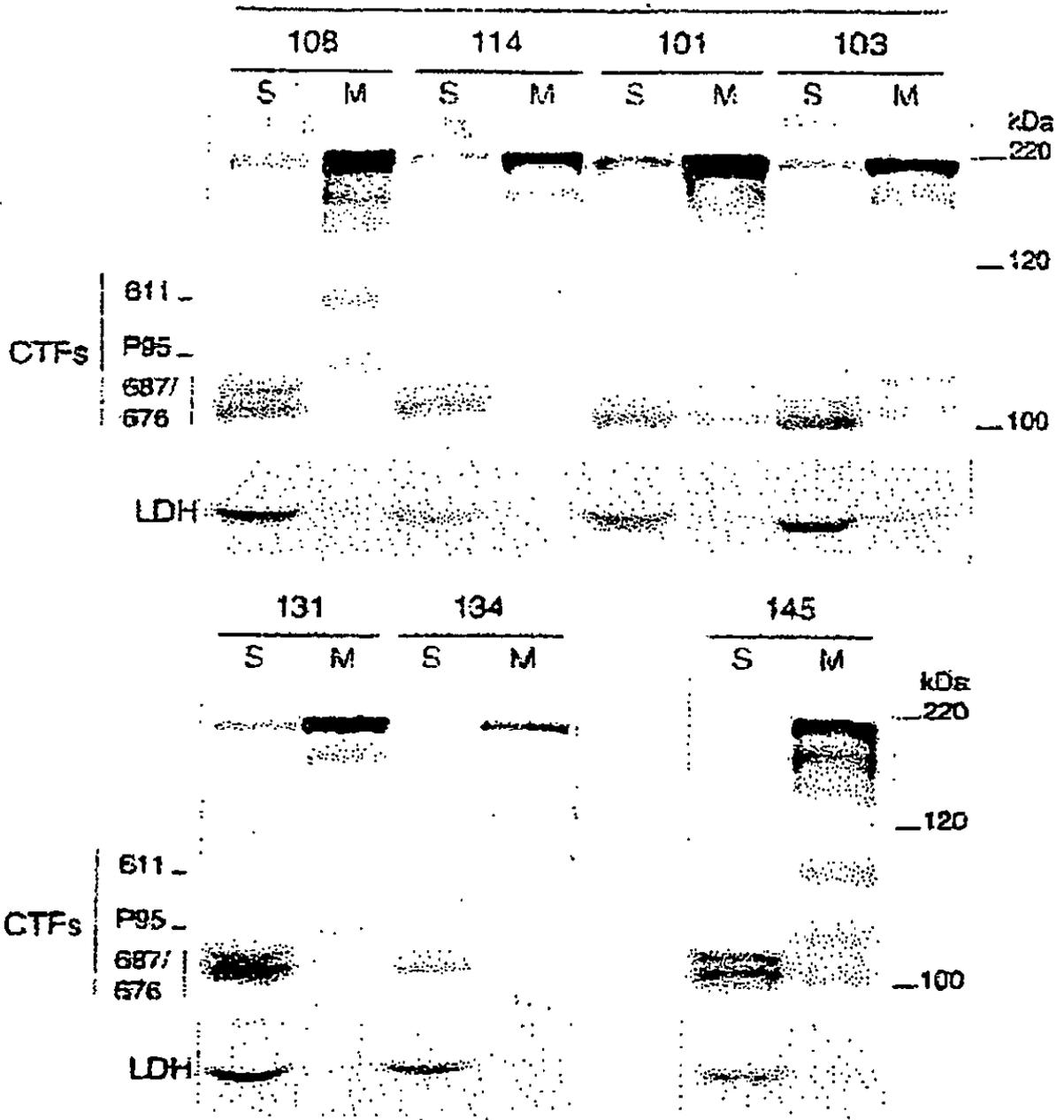


FIG. 2

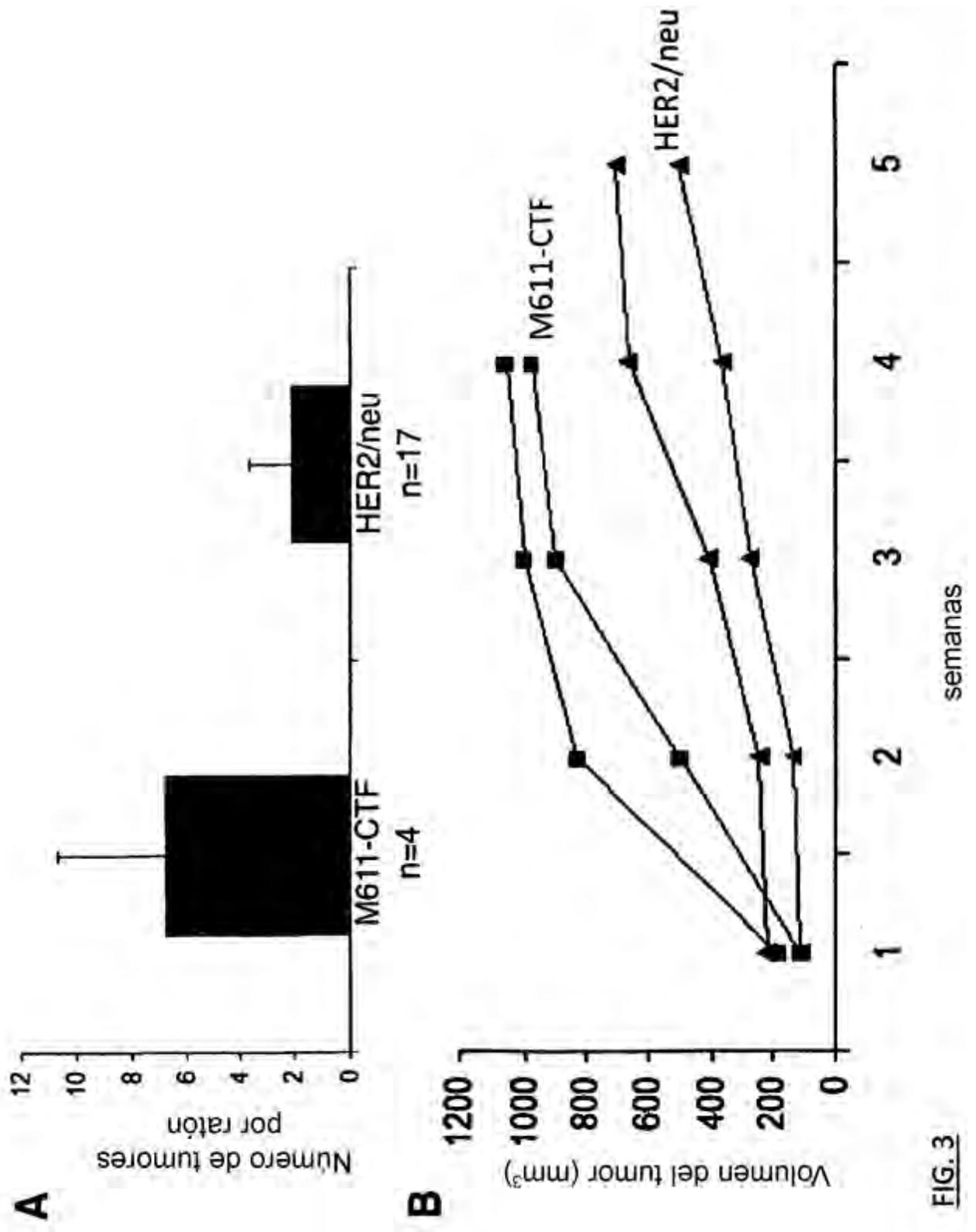


FIG. 3

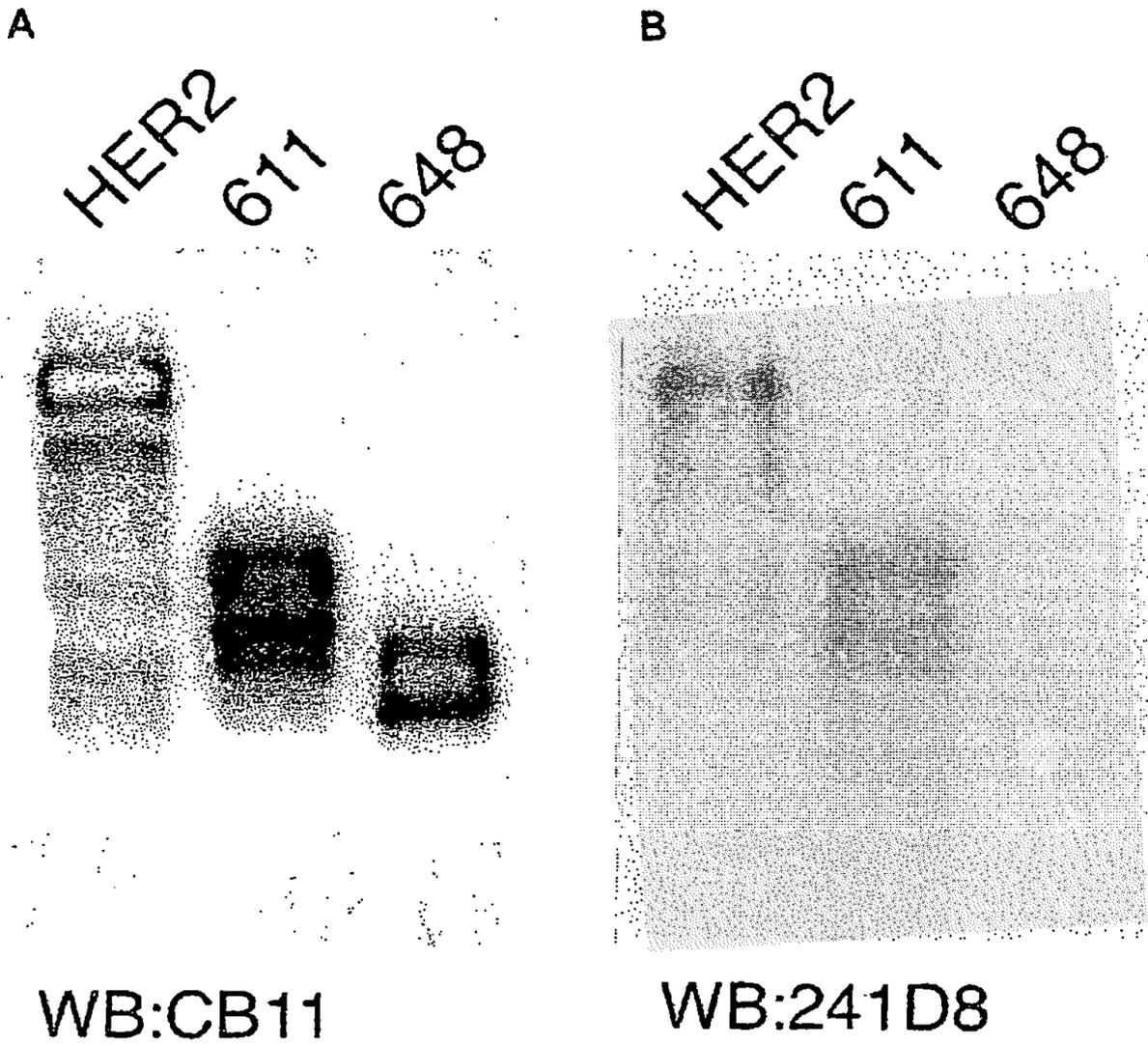


FIG. 4

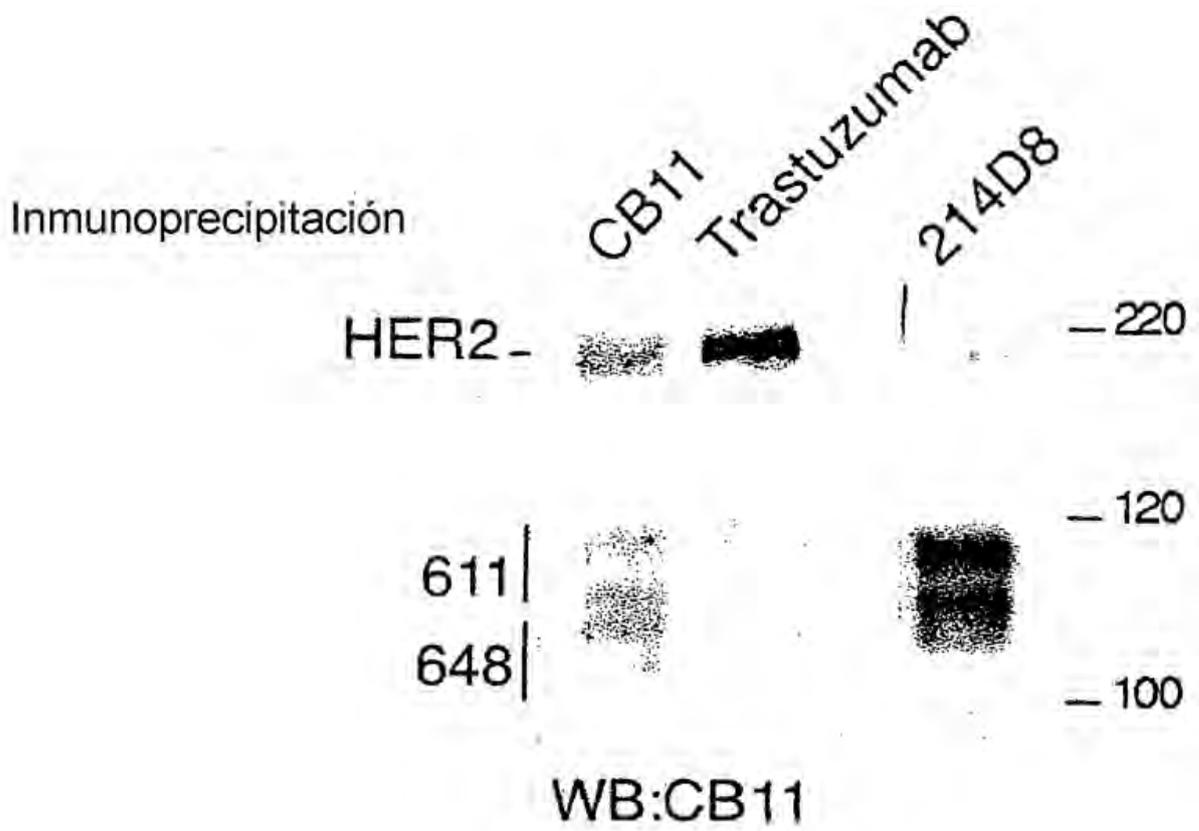
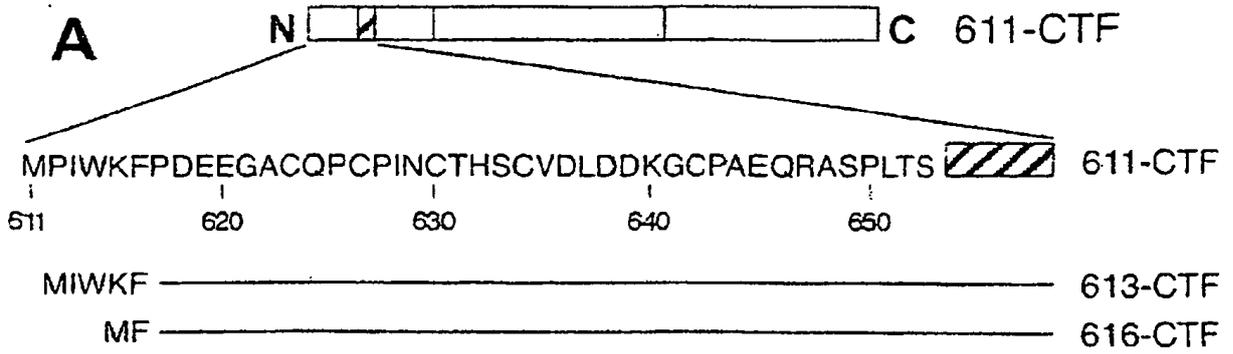


FIG. 5



B

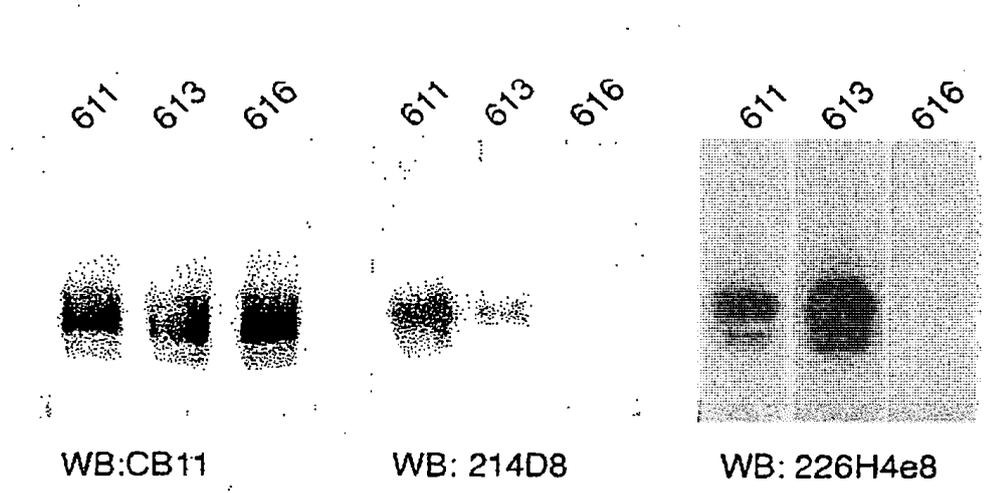


FIG. 6

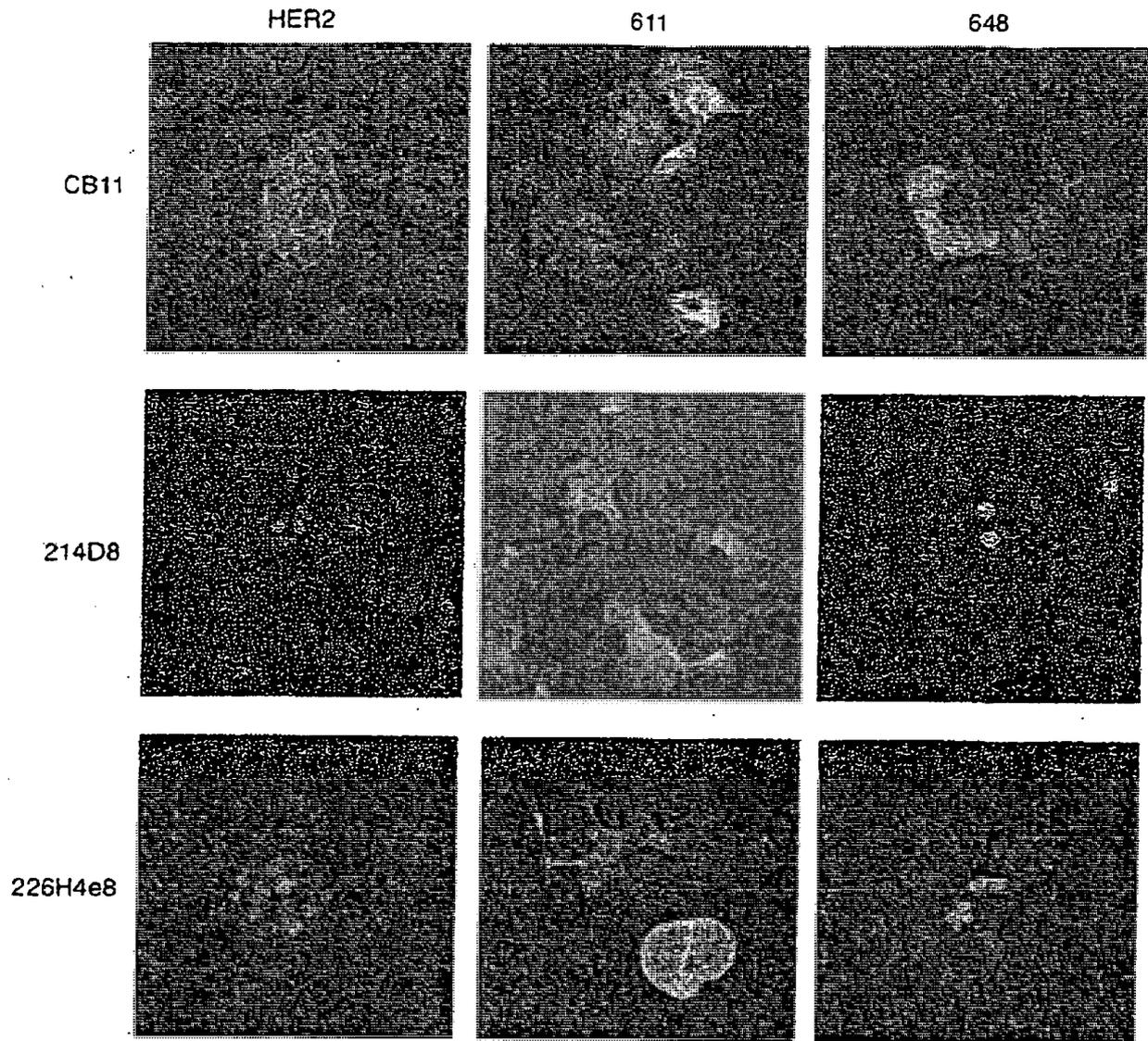


FIG. 7

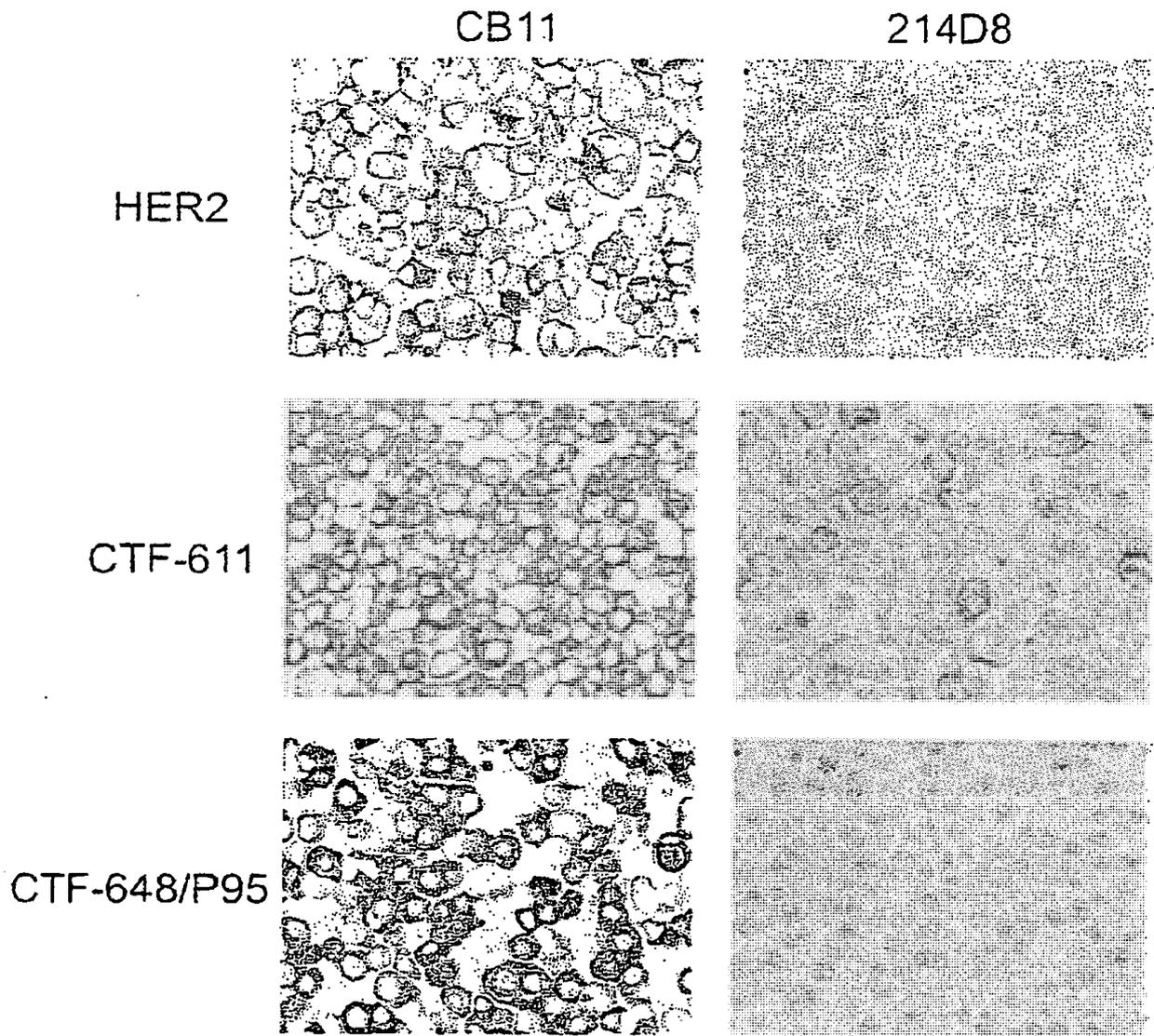


FIG. 8