

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 154**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2012 PCT/US2012/023871**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2012 E 12741931 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2670436**

54 Título: **Anticuerpos Foxc1 y métodos de su utilización**

30 Prioridad:

04.02.2011 US 201161439825 P

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

15.11.2017

73 Titular/es:

**JOHN WAYNE CANCER INSTITUTE (100.0%)
2200 Santa Monica Boulevard
Santa Monica, CA 90404, US**

72 Inventor/es:

CUI, XIAOJIANG

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 642 154 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 FOXC1 Y MÉTODOS DE SU UTILIZACIÓN

5 ANTECEDENTES

Los factores de transcripción de estructura de horquilla, incluyendo la estructura de horquilla C1 (FOXC1), son factores de transcripción caracterizados por un dominio común de unión de ADN de hélice alada de 100 aminoácidos denominado dominio de estructura de horquilla y juegan papeles importantes en la regulación de la expresión de genes implicados en el crecimiento, supervivencia, diferenciación del desarrollo del mesodermo embrionario, migración y longevidad de células (Nishimura et al., 1998). Como resultado de los estudios descritos en el presente documento, se ha determinado que la expresión de FOXC1 en el cáncer de mama humano, tanto en el nivel de ARNm como de proteína, se produce de manera consistente y exclusiva en los cánceres de mama de tipo basal (BLBC). El cáncer de mama de tipo basal (BLBC) tiene un pronóstico pobre y se identifica a menudo por un fenotipo triple negativo (ER-/PR-/HER2-) y citoqueratinas basales. Recientemente, sin embargo, la sobreexpresión de mRNA para el factor de transcripción FOXC1 se ha identificado como un importante biomarcador pronóstico de BLBC (Ray et al., 2010). También se ha encontrado que la expresión de la proteína FOXC1 es un predictor significativo de la supervivencia global en análisis univariados y multivariados (Ray et al., 2010).

Aunque se han descrito muchos genes como biomarcadores característicos de ciertos tipos de cáncer y muchos otros se describen como de importancia funcional para la supervivencia y el mantenimiento del fenotipo maligno, muy pocos han demostrado tener una fuerte significación a nivel de pronóstico. Esto se debe a que muy pocos son críticos por sí mismos y en su lugar forman parte de redes extremadamente grandes y complejas de biomoléculas cuya función global no puede determinarse a menos que se identifiquen las moléculas que son más centrales y pivotales en la red. Se ha demostrado que FOXC1 tiene una alta significación pronóstica, siendo predictivo de la alta tasa de mortalidad y metástasis asociada específicamente con cánceres de mama de tipo basal. Por lo tanto, FOXC1 es un biomarcador indicativo y característico de BLBC. La significación clínica de FOXC1 en lo que se refiere a cánceres de mama de tipo basal se describe en detalle en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US10/44817, presentada el 6 de agosto de 2010.

El significado clínico de la expresión de FOXC1 no se limita al cáncer de mama, sino que puede extenderse a otros tipos de cáncer, incluyendo pero sin limitarse a tumores cerebrales (como glioblastoma multiforme o astrocitoma), cáncer de colon, cáncer gástrico, melanoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata insensible a los andrógenos), cáncer de células renales, sarcomas (como sarcoma sinovial) y leucemia. Se ha demostrado que la expresión de FOXC1 define subconjuntos agresivos biológicamente y clínicamente en dichos cánceres y puede utilizarse tanto como biomarcador diagnóstico como pronóstico para estos tipos específicos de cáncer. Además, FOXC1 es un objetivo terapéutico adecuado para BLBC y los otros tipos específicos de cáncer descritos anteriormente. Por lo tanto, se desea el desarrollo de sustancias que se dirigen a FOXC1 y son adecuados para su uso en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de BLBC y otros cánceres.

Los hallazgos descritos anteriormente tienen implicaciones claras e importantes para la medicina personalizada y el cuidado personalizado del cáncer, ya que la detección del estado de FOXC1 de los subgrupos específicos descritos de pacientes con cáncer de mama (y/u otros tipos de cáncer descritos anteriormente) permitirá intervenciones terapéuticas más personalizadas y específicas con una mayor probabilidad de detener la progresión de la enfermedad, alargar la esperanza de vida o incluso lograr una cura.

Ray et al. (Ray, P.S. et al., 2009, Journal of clinical oncology, vol. 27, no. 15, página 11016) describe que FOXC1 es un determinante dominante del fenotipo similar a basal del cáncer de mama. Taube et al. (Taube, J.H., 2010, PNAS, vol. 107, no. 35, páginas 15449-15454) describe que la expresión de FOXC1 marca tumores similares a basales. Muggerud et al. (Muggerud, A.A. et al., 2010, Breast Cancer Research, vol. 12, no. 1, página R3) describe un incremento de la frecuencia de metilación del gen FOXC1 en tumores invasivos. Berry et al. (Berry, F.B. et al., 2002, JBC, vol. 227, no. 12, páginas 10292-10297) describe dominios estructurales de FOXC1 incluyendo dominios de activación N- and C-terminales. Ray et al. (Ray, P.S. et al., 2010, Cancer Research, vol. 70, no. 10, páginas 3870-3876) describe que FOXC1 es un biomarcador pronóstico potencial con una significación funcional en cáncer de mama similar a basal.

60 RESUMEN

En un primer aspecto, la invención se dirige a un anticuerpo aislado que enlaza una secuencia de péptidos antigénicos correspondiente al dominio de transactivación de N-terminales del FOXC1 humano, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, en que la secuencia de péptidos antigénicos comprende aminoácidos 51-75 de FOXC1 humano (SEQ ID NO:1), y en que el anticuerpo aislado se utiliza para detectar FOXC1 en una prueba de inmunidad in vitro.

En diversas formas de realización, el anticuerpo es producido por una línea de células de hibridoma.

5 En diversas formas de realización, la secuencia peptídica antigénica es:

5'-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3'(SEQ ID NO:2); o
5'-C-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:3).

10 En un segundo aspecto, la invención se dirige a un método in vitro para diagnosticar un cáncer de mama de tipo basal en un sujeto que tiene cáncer de mama o que se sospecha que tiene cáncer de mama, en que el método comprende:

15 contactar con una o más células de cáncer de mama en una muestra biológica con un anticuerpo FOXC1 conjugado con un agente diagnóstico, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, y en que el anticuerpo FOXC1 une una secuencia de péptidos antigénicos correspondiente al dominio de transactivación N-terminal de FOXC1 y que comprende aminoácidos 51-75 de FOXC1 (SEQ ID NO:1);
20 detectar la presencia o ausencia de FOXC1 en la una o más células de cáncer de mama; y diagnosticar que el sujeto tiene un cáncer de mama de tipo basal cuando está presente FOXC1.

25 En diversas formas de realización, la muestra biológica es una muestra de tumor primario o metastático, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de linfa, una muestra de ganglio linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de médula ósea, una muestra de fluido intersticial o una muestra de orina.

30 En diversas formas de realización, el agente diagnóstico es una sustancia radiactiva, un agente de contraste de colorantes, un compuesto o molécula fluorescente, un compuesto o molécula bioluminiscente, enzima o un agente potenciador.

35 En diversas formas de realización, la detección de la presencia o ausencia de FOXC1 se consigue mediante un inmunoensayo in vitro, como por ejemplo inmunocitoquímica (ICC), inmunohistoquímica (IHC), Western blot o hibridación fluorescente in situ (FISH).

40 En diversas formas de realización, el método comprende además:

Lisado o permeabilización de las una o más células de cáncer de mama cuando el inmunoensayo in vitro utiliza el contenido de todas las células o los preparados de todas las células.

45 En diversas formas de realización, el anticuerpo FOXC1 se conjuga con un agente de administración intracelular.

En diversas formas de realización, la secuencia peptídica antigénica es:

45 5'-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:2); o
5'-C-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:3).

50 El agente de diagnóstico puede ser cualquier sustancia adecuada, incluyendo una sustancia radiactiva, un colorante o agente de contraste, un compuesto o molécula fluorescente, un compuesto o molécula bioluminiscente o una enzima o agente potenciador.

55 La detección de la presencia o ausencia de FOXC1 se consigue mediante un inmunoensayo in vitro, como por ejemplo inmunocitoquímica (ICC), inmunohistoquímica (IHC), Western blot o hibridación fluorescente in situ (FISH). Alternativamente, puede utilizarse una modalidad de formación de imágenes in vivo, como por ejemplo imagen de resonancia magnética (MRI), tomografía de emisión de positrones (PET) o microPET, tomografía computerizada (CT), marcador de combinación PET/CT, dispositivo cargado acoplado refrigerado (CCD), imágenes ópticas de cámara, imágenes ópticas y tomografía computerizada de emisión de fotón simple (SPECT). Cuando la presencia o ausencia de FOXC1 se determina por un método in vivo, el anticuerpo FOXC1 o su fragmento funcional debe conjugarse con un agente de administración intracelular para facilitar la administración del anticuerpo o fragmento funcional del mismo al citoplasma de las células
60 objetivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una inmunotransferencia de células de cáncer de mama humano MCF-7 que se transfectoron con FOXC1 (+) o vector (-) utilizando anticuerpos policlonales FOXC1 comerciales (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpos monoclonales FOXC1 aislados de la línea celular de hibridomas B2E3. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:100.

La Figura 2 son imágenes representativas de células de cáncer de mama humano MCF-7 transfectadas con GFP-FOXC1 (A) en las que se realizó tinción de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales FOXC1 aislados de la línea celular de hibridoma B2E3 para detectar células (B) transfectadas satisfactoriamente. Se usó DAPI para teñir el ADN de todas las células (C).

La Figura 3 muestra imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica de FOXC1 en dos muestras representativas de cáncer de mama (tejido de cáncer de mama positivo FOXC1 y tejido de cáncer de mama negativo FOXC1) utilizando anticuerpos monoclonales FOXC1 aislados de la línea celular de hibridoma B2E3.

La Figura 4 es la secuencia de la proteína C1 de caja de horquilla humana (FOXC1) (SEQ ID NO:1, número de acceso AAH70124). La secuencia de péptidos antigénicos objetivo utilizada para generar anticuerpos monoclonales FOXC1 de acuerdo con algunas formas de realización está en negrita y subrayada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La descripción está dirigida a anticuerpos que se unen específicamente a la proteína C1 de caja de horquillas (FOXC1) y a métodos de diagnóstico in vitro de acuerdo con las reivindicaciones pendientes. De acuerdo con algunas formas de realización descritas en la presente memoria, dichos anticuerpos anti-FOXC1 pueden usarse en métodos para diagnosticar y tratar el cáncer de mama de tipo basal y se generaron para desarrollar un enfoque conveniente, pragmático y eficiente para ensayos inmunohistoquímicos que explotan el potencial de diagnóstico de FOXC1 en la gestión del cáncer de mama.

Un anticuerpo tal como se describe en el presente documento es una molécula que incluye una inmunoglobulina intacta o una o más partes de una inmunoglobulina o molécula relacionada con inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con un epítipo antigénico de una sustancia objetivo (por ejemplo, una proteína objetivo). Dicha inmunoglobulina o molécula relacionada con inmunoglobulina puede incluir anticuerpos monoclonales o policlonales de cualquier isotipo (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), anticuerpos modificados o fragmentos de anticuerpos funcionales.

El término anticuerpo modificado incluye, aunque sin limitación, formas modificadas genéticamente o modificadas de otro modo de inmunoglobulinas o fragmentos funcionales de las mismas, como por ejemplo intracuerpos, pepticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos bivalentes o biespecíficos y anticuerpos conjugados (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos). Los anticuerpos modificados pueden ser monovalentes o multivalentes. El término fragmento de anticuerpo funcional incluye uno o más fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos de anticuerpos solos o en combinación con otras moléculas, incluyendo, pero sin limitación, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, scFv y fragmentos de dominio único. Ejemplos de los tipos de anticuerpos, anticuerpos modificados y fragmentos de anticuerpos funcionales que pueden utilizarse de acuerdo con las formas de realización descritas en el presente documento se describen adicionalmente en Huson PJ y Souriau C, Engineered Antibodies, Nature Medicine (2003) 9(1):129-134.

Anticuerpos FOXC1

Los anticuerpos descritos en el presente documento se unen específicamente a una secuencia de péptidos antigénicos objetivo de FOXC1 humano (Figura 4; SEC ID NO:1). La secuencia de péptidos antigénicos objetivo corresponde a un epítipo presente en el estado nativo intacto de la proteína objetivo, FOXC1. La secuencia de péptidos antigénicos objetivo corresponde a un epítipo continuo (es decir, compuesto por una secuencia contigua de aminoácidos en una proteína).

Diversas características son importantes para seleccionar una secuencia de péptidos antigénicos objetivo adecuada dentro de una secuencia de proteína objetivo como por ejemplo FOXC1. Los epítipos antigénicos potenciales dentro de una secuencia de proteína objetivo deberían tener, pero no estar limitados a, las siguientes características: (i) hidrófilo, porque la mayoría de las proteínas naturales en soluciones acuosas tienen residuos hidrofílicos en la superficie y residuos hidrofóbicos en el interior; (ii) orientada a la superficie, porque los anticuerpos y sus fragmentos funcionales generalmente se unen a epítipos sobre la superficie de las proteínas; y (iii) flexible, porque se ha demostrado que los epítipos tienen un alto grado de movilidad. Los algoritmos para predecir características de proteínas tales como hidrofilia/hidrofobicidad y regiones de

estructura secundaria tales como hélice alfa, hoja beta y giro beta pueden ayudar a seleccionar una secuencia interna inmunogénica potencialmente expuesta para la generación de anticuerpos. Se puede utilizar un paquete de software comercial para ayudar a seleccionar una secuencia de péptidos antigénicos objetivo, tal como MacVector™, DNASTar™ y PC-Gene™. Los anticuerpos de la invención se unen a una secuencia de péptidos antigénicos objetivo que corresponde al dominio de transactivación N-terminal de FOXC1. La secuencia de péptidos antigénicos objetivo es 5'-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:2), que corresponde a los aminoácidos 51 a 75 de SEQ ID NO:1 (véase la Figura 4).

En el presente documento también se describe que una secuencia de péptidos antigénicos objetivo puede conjugarse con una proteína vehículo para aumentar su inmunogenicidad. Las proteínas vehículos pueden incluir epítopos que estimulan células T auxiliares, que a su vez ayudan a inducir la respuesta de las células B frente a la secuencia del péptido antigénico objetivo. Por ejemplo, el péptido vehículo puede incluir, pero no está limitado a, hemacianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA) y albúmina de suero de conejo (RSA).

La conjugación de la secuencia de péptidos antigénicos objetivo a la proteína vehículo puede realizarse mediante un método de acoplamiento adecuado. El método de acoplamiento es un método de carbodiimida que utiliza carbodiimidias que pueden activar los grupos carboxílicos de cadena lateral de ácido aspártico y glutámico así como el grupo carboxilo terminal para convertirlos en sitios reactivos para acoplamiento con aminos primarias. Alternativamente, el glutaraldehído puede utilizarse como un reactivo de acoplamiento bifuncional que enlaza dos compuestos a través de sus grupos amino. En otro aspecto, se puede usar el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS) para enlazar péptidos a proteínas vehículos a través de cisteínas. El acoplamiento tiene lugar con el grupo tiol de residuos de cisteína. Si la secuencia elegida no contiene Cys, puede colocarse un residuo Cys en el terminal N- o C- para obtener una unión controlada del péptido a la proteína vehículo. Por lo tanto, la secuencia de péptidos antigénicos objetivo descrita anteriormente (SEQ ID NO:2; 5'-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3') puede tener una cisteína añadida al terminal N para ayudar en su conjugación a una proteína vehículo según sea necesario (por ejemplo, 5'-C-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3'; SEQ ID N°:3).

En algunas formas de realización, el anticuerpo que se une específicamente a una secuencia de péptidos antigénicos objetivo de FOXC1 humano (el "anticuerpo FOXC1" o los "anticuerpos FOXC1") es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos porque están dirigidos contra un único sitio antigénico. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales son útiles para mejorar la selectividad y la especificidad de los ensayos analíticos y de diagnóstico así como las aplicaciones terapéuticas en comparación con las preparaciones policlonales convencionales.

En el presente documento también se describe que el anticuerpo FOXC1 es un fragmento funcional del anticuerpo monoclonal FOXC1 tal como se ha descrito anteriormente. El fragmento funcional del anticuerpo monoclonal FOXC1 puede ser una parte del anticuerpo (por ejemplo, un dominio), que retiene la capacidad de unirse específicamente a una secuencia de péptidos antigénicos objetivo de FOXC1 humana. Los ejemplos de dichos fragmentos de anticuerpos incluyen: F(ab')₂, Fab', Fab, Fv de cadena sencilla (en adelante referido como "scFv"), Fv unido a disulfuro (en adelante, denominado "dsFv"), un polímero del mismo, región V dimérica (en lo sucesivo denominado "diacuerpo"), y péptidos o peptidocuerpos que contienen regiones determinantes de complementariedad (CDR).

Se pueden utilizar varios métodos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos, incluyendo hibridoma, biblioteca de fagos y técnicas recombinantes (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E. y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, y Making and Using Antibodies: A Practical Handbook, Howard G y Kaser M, 2006, CRC Press; Los anticuerpos FOXC1 descritos en el presente documento se generan mediante una línea celular de hibridoma. La línea celular de hibridoma se produce mediante una técnica de hibridoma adecuada conocida en la técnica, como por ejemplo la descrita por Kohler y Milstein (Kohler & Milstein, 1975). En una técnica de hibridoma, un animal huésped (por ejemplo, un ratón o conejo) se inmuniza habitualmente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, el animal puede inmunizarse con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica FOXC1 o un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo o los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. Dichos métodos de producción de mAb recombinante se describen más adelante.

El agente inmunizante puede ser un antígeno de proteína objetivo (por ejemplo, FOXC1), un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo (por ejemplo, las secuencias de péptido antigénico objetivo de FOXC1 humano; SEQ ID NO:2-3). Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada (por ejemplo, células de mieloma) utilizando un agente de fusión adecuado, como por ejemplo polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Las células de hibridoma se cultivan después en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo

para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT.

5 A continuación, el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ser ensayado para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno.

10 Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante un método adecuado conocido en la técnica, como por ejemplo inmunoprecipitación o un ensayo de unión in vitro, como por ejemplo radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

15 Una vez que se identifican las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitados y cultivarse mediante métodos estándar. (Ver Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) páginas 59-103). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como ascitis en un mamífero.

20 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido ascítico mediante un procedimiento de purificación de inmunoglobulina conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, la proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapetato, electroforesis en gel, diálisis o afinidad cromatografía.

25 Los anticuerpos pueden prepararse por métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica. Se describen métodos para la producción recombinante de anticuerpos monoclonales, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.397 de Boss et al. (caducada) y la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 de Cabilly (caducada). El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales FOXC1 descritos en este documento puede aislarse y secuenciarse usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que son transfectados a continuación en células huésped (por ejemplo, células COS simies, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen proteína de inmunoglobulina) que sintetizan los anticuerpos monoclonales. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas o uniendo covalentemente la totalidad o parte de una secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina a la secuencia de codificación de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o puede ser sustituido por los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

40 En el presente documento también se describe que los fragmentos de anticuerpo pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en E. coli de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpos por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente utilizando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Alternativamente, una escisión enzimática que utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. También pueden usarse otros métodos de escisión de anticuerpos, como por ejemplo separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera pesada monovalente, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

55 En algunas formas de realización, pueden producirse variantes conservadoras de los anticuerpos. Dichas variantes conservadoras empleadas en anticuerpos o fragmentos de anticuerpos funcionales deben retener residuos de aminoácidos que son necesarios para plegarse y estabilizarse correctamente entre las regiones V_H y V_L y conservarán las características de carga de los residuos con el fin de preservar el punto isoeléctrico (pi) bajo y la baja toxicidad de las moléculas. Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en las regiones V_H y V_L para aumentar el rendimiento. Las tablas de sustitución de aminoácidos conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas por los expertos en la técnica. Generalmente, las variantes conservadoras se unirán al antígeno objetivo con una eficacia igual o mayor que el anticuerpo monoclonal parental.

65 Una vez que se puede determinar la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que es específico de una secuencia de péptidos antigénicos objetivo de FOXC1 humano tal como las descritas anteriormente se puede diseñar una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos. Además, se pueden construir una diversidad de clones que contienen moléculas de ácido nucleico funcionalmente

equivalentes, como por ejemplo moléculas de ácido nucleico que difieren en secuencia pero que codifican el mismo efecto o molécula o secuencia de anticuerpos. Por lo tanto, en el presente documento se describen también ácidos nucleicos que codifican anticuerpos específicos de FOXC1 o fragmentos funcionales de los mismos (tales como los específicos para el epítipo AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD, aminoácidos 51 a 75 de SEQ ID NO:1), conjugados y proteínas de fusión.

Derivados y conjugados anti-FOXC1

En algunas formas de realización, los anticuerpos FOXC1 pueden incluir derivados de anticuerpos que se modifican químicamente. Por ejemplo, los derivados de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que han sido modificados por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación o derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica y enlaces a un ligando celular u otra proteína. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a, escisión química específica, acetilación, gormilación y síntesis metabólica de tunicamicina. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

En otras formas de realización, el anticuerpo FOXC1 o fragmento de anticuerpo funcional puede conjugarse con otra sustancia para formar un conjugado anti-FOXC1. Los conjugados anti-FOXC1 descritos en el presente documento se pueden preparar mediante métodos conocidos de unión de anticuerpos con lípidos, carbohidratos, proteínas u otros átomos y moléculas. En un aspecto, el conjugado anti-FOXC1 se forma por conjugación específica del sitio utilizando un enlace o unión adecuados. Es más probable que la conjugación específica del sitio preserve la actividad de unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional. La sustancia puede conjugarse o unirse en la región bisagra de un componente de anticuerpo o fragmento de anticuerpo reducido mediante la formación de un enlace disulfuro. Por ejemplo, la introducción de residuos de cisteína en el extremo C-terminal de un fragmento scFv, como por ejemplo los que se introducen en los cis- diacuerpos descritos anteriormente, permite el acoplamiento tiol-reactivo específico del sitio en un sitio alejado del sitio de unión al antígeno a una amplia variedad de los agentes. Alternativamente, otros enlaces o enlaces utilizados para formar el conjugado anti-FOXC1 pueden incluir, pero no están limitados a, un enlace covalente, un enlace no covalente, un enlace sulfuro, un enlace hidrazona, un enlace hidrazina, un enlace éster, un enlace amido, y un enlace amino, un enlace imino, un enlace tiosemicabazona, un enlace semicabazona, un enlace oxima y un enlace carbono-carbono.

En una forma de realización, el conjugado anti-FOXC1 puede incluir un anticuerpo FOXC1 conjugado con un agente de administración intracelular. En un aspecto, el agente de administración es un péptido que penetra en las células. Los péptidos penetrantes de células son péptidos cortos que facilitan la captación celular de diversas moléculas y sustancias (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos), para la administración de dichas moléculas y sustancias al citoplasma de una célula. Esto se logra mediante la explotación de diversos procesos celulares tales como la penetración directa de la membrana plasmática, el transporte mediado por endocitosis y la translocación mediante la formación de una estructura transitoria. Los péptidos penetrantes de células que pueden utilizarse para formar un conjugado anti-FOXC1 para administración intracelular incluyen, pero no se limitan a, la proteína Trans-Activadora de Transcripción (TAT) (Mie et al., 2003, Wadia et al. 2004, Kameyama et al, 2006), la proteína esencial durante la penetración 1 (Pep-1) (Morris et al., 2001). Otros agentes de administración que pueden utilizarse para suministrar el anticuerpo FOXC1 o el fragmento funcional que contiene incluyen, pero no se limitan a, lípidos catiónicos (Weill et al., 2008), poli-L-arginina (Chen & Erlanger 2002); fármacos liposomiales (Roth et al., 2007) y vehículos poliméricos (por ejemplo, poli (ácido propil acrílico, PPA) (Stayton et al., 2005).

En una forma de realización, el conjugado anti-FOXC1 puede incluir un anticuerpo FOXC1 conjugado con un agente de diagnóstico. Un "agente de diagnóstico" es un átomo, molécula, compuesto u otra sustancia que es útil para diagnosticar, detectar o visualizar el cáncer u otras condiciones asociadas con FOXC1 por métodos in vitro o ex vivo conocidos en la técnica y que se describen a continuación. De acuerdo con las formas de realización descritas en la presente memoria, los agentes de diagnóstico pueden incluir, pero no se limitan a, sustancias radiactivas (por ejemplo, radioisótopos, radionucleidos, radiomarcadores o radio trazadores), colorantes, agentes de contraste, compuestos fluorescentes o moléculas, compuestos o moléculas bioluminiscentes, enzimas y agentes potenciadores (por ejemplo, iones paramagnéticos). Además, debe observarse que algunas nanopartículas, por ejemplo puntos cuánticos y nanopartículas metálicas (que se describen más adelante) también pueden ser adecuadas para su uso como agente de detección.

Las sustancias radiactivas que pueden utilizarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las formas de realización de la descripción incluyen, pero no se limitan a, ^{18}F , ^{32}P , ^{33}P , ^{45}Ti , ^{47}Sc , ^{52}Fe , ^{59}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{75}Sc , ^{77}As , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Sr , ^{89}Zr , ^{94}Tc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{99}Mo , ^{105}Pd , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{153}Sm , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{169}Er , ^{175}Lu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{211}At , ^{211}Pb , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{213}Bi , ^{223}Ra y ^{225}Ac . Los iones paramagnéticos que pueden utilizarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las formas de realización de la descripción incluyen, pero no

se limitan a, iones de metales de transición y lantánidos (por ejemplo metales que tienen números atómicos de 6 a 9, 21-29, 42, 43, 44 o 57-71). Estos metales incluyen iones de Cr, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb y Lu.

5 Cuando el agente diagnóstico es un metal radioactivo o un ion paramagnético, el agente puede hacerse reaccionar con un reactivo que tiene una cola larga con uno o más grupos quelantes unidos a la cola larga para unir estos iones. La cola larga puede ser un polímero como por ejemplo una polilisina, un polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tenga grupos pendientes a los que se pueda unir a un grupo quelante para unir los iones. Los ejemplos de grupos quelantes que se pueden usar de acuerdo con la descripción incluyen, pero no se limitan a, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dietilentriaminopentaacético (DTPA), DOTA, NOTA, NETA, porfirinas, poliaminas, éteres corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares. El quelato está normalmente unido al anticuerpo FOXC1 por un grupo que permite la formación de un enlace a la molécula con pérdida mínima de inmunoreactividad y agregación mínima y/o reticulación interna. Los mismos quelatos, cuando se complejan con metales no radiactivos, como por ejemplo manganeso, hierro y gadolinio, son útiles para la RM, cuando se utilizan junto con los anticuerpos y vehículos descritos en la presente memoria. Los quelatos macrocíclicos como por ejemplo NOTA, DOTA y TETA son de uso con una variedad de metales y radiometales incluyendo, pero sin limitarse a, radionúclidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Pueden usarse otros quelatos de tipo anillo tales como poliéteres macrocíclicos, que son de interés para los nuclidos que se unen establemente, como por ejemplo ²²³Ra para RAIT. En ciertas formas de realización, los restos quelantes pueden usarse para unir un agente de formación de imágenes de PET, como por ejemplo un complejo Al-¹⁸F, a una molécula objetivo para su utilización en análisis de PET.

25 Los compuestos o moléculas bioluminescentes y fluorescentes y los colorantes que pueden utilizarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las formas de realización de la descripción incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo cloruro, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Oregon Green™, rodamina, rojo de Texas, tetrarhodimina isotiocianato (TRITC), Cy3, Cy5, fósforo lantánido, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), ficoeritrina y compuestos fluorescentes autocongelados que son activados por proteasas y enzimas asociadas a tumores (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, nanopartículas, biotina, digoxigenina) o una combinación de las mismas.

35 Las enzimas que pueden utilizarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las formas de realización de la descripción incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β-galactosidasa, β-glucoronidasa o β-lactamasa. Dichas enzimas se pueden utilizar en combinación con un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminogénico para generar una señal detectable.

40 Aunque no entra dentro del ámbito de la invención tal como se reivindica, en el presente documento también se describe un conjugado anti-FOXC1 que puede incluir un anticuerpo FOXC1 o fragmento de anticuerpo FOXC1 funcional conjugado con un agente terapéutico. Un "agente terapéutico" tal como se utiliza en la presente memoria es un átomo, molécula, compuesto u otra sustancia que es útil en el tratamiento del cáncer u otras afecciones asociadas con FOXC1. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a, fármacos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos y fragmentos de anticuerpos, toxinas, radioisótopos, enzimas (por ejemplo, enzimas para escindir los profármacos a un agente citotóxico en el sitio del tumor), nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, oligonucleótidos antisentido, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos y colorantes.

50 Los agentes quimioterapéuticos son a menudo citotóxicos o citostáticos por naturaleza y pueden incluir agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, terapia hormonal con inhibidores mitóticos, terapéutica dirigida e inmunoterapéuticos. En algunas formas de realización, los agentes quimioterapéuticos que pueden utilizarse como agentes terapéuticos de acuerdo con las formas de realización de la descripción incluyen, pero no se limitan a, ácido 13-cis-retinoico, 2-clorodeoxiadenosina, 5-azacitidina, 5-fluorouracilo, 6-Mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina-D, adriamicina, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, ácido totalmente transretinoico, alfa interferón, altretamina, ametopterina, amifostina, anagrelida, anastrozol, arabinosilcitosina, trióxido de arsénico, amsacrina, aminocampotecina, aminoglutetimida, asparaginasa, azacitidina, bacilo calmante-guerin (BCG), bendamustina, bevacizumab, bexaroteno, bicalutamida, bortezomib, bleomicina, busulfán, leucovorina de calcio, factor citrovorum, capecitabina, canertinib, carboplatino, carmustina, cetuximab, clorambucil, cisplatino, cladribina, cortisona, ciclofosfamida, citarabina, darbepoetina alfa, dasatinib, daunomicina, decitabina, denileucina difitox, dexametasona, dexasona, dextrazoxano, dactinomicina, daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, doxilfluorina, eniluracilo, epirubicina, epoetina alfa, erlotinib, everolimus, exemestano, estramustina, etopósido, filgrastim, fluoxesterona, fulvestrant, flavopiridol, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab, ozogamicina, goserelina, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos, hexametilmelamina, hidrocortisona, hidroxiurea, ibritumomab, interferón alfa, interleucina-2, interleucina-11, isotretinoína, ixabepilona, idarubicina, mesilato de imatinib, ifosfamida,

irinotecán, lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida, Ara-C liposomal, lomustina, mecloretamina, megastrol, melfalan, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metilprednisolona, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nelarabina, nilutamida, octreótido, oprelvekin, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pemetrexed, panitumumab, PEG Interferón, pegaspargasa, pegfilgrastim, PEG-L-asparaginasa, pentostatina, plicamicina, prednisolona, prednisona, procarbazona, raloxifeno, rituximab, romiplostim, raltrexed, sapacitabina, sargramostim, satraplatino, sorafenib, sunitinib, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, tegafur, tegafur-uracilo, temsirolimus, temozolamida, tenipósido, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, trimitrexato, alrubicina, vincristina, vinblastina, vindestina, vinorelbina, vorinostat o ácido zoledrónico.

En el presente documento también se describe que los anticuerpos terapéuticos y sus fragmentos funcionales que pueden utilizarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las formas de realización de la descripción, incluyen, pero sin limitación, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, edrecolomab, gemtuzumab, ibritumomab tiuxetan, panitumumab, rituximab, tositumomab y trastuzumab

Asimismo, en el presente documento también se describe que las toxinas que pueden usarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las formas de realización de la descripción incluyen, pero no se limitan a, ricina, abrina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-estafilococal A, proteína antiviral de phytolacca americana, gelonina, toxina diftérica, Exotoxina de Pseudomonas y endotoxina de Pseudomonas.

Los radioisótopos que pueden utilizarse como agentes de diagnóstico de acuerdo con las formas de realización de la descripción incluyen, pero no se limitan a, ^{32}P , ^{89}Sr , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{44}Ti , ^{131}I , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{213}Bi , ^{223}Ra y ^{225}Ac .

En otra forma de realización, el conjugado anti-FOXC1 puede incluir un anticuerpo FOXC1 conjugado a una nanopartícula. El término nanopartícula se refiere a una partícula microscópica, cuyo tamaño se mide en nanómetros, por ejemplo, una partícula con al menos una dimensión inferior a aproximadamente 100 nm. Las nanopartículas son particularmente útiles como sustancias detectables porque son lo suficientemente pequeñas para dispersar la luz visible en lugar de absorberla. Por ejemplo, las nanopartículas de oro poseen propiedades de extinción de luz visible significativas y aparecen de color rojo oscuro a negro en solución. Como resultado, pueden utilizarse composiciones que comprenden anticuerpo específico de FOXC1 o fragmentos conjugados a nanopartículas para la formación de imágenes in vivo de tumores o células cancerosas en un sujeto. En el extremo pequeño de la gama de tamaños, las nanopartículas se denominan a menudo como racimos. Se han formado nanopartículas de metal, dieléctricas y semiconductoras, así como estructuras híbridas (por ejemplo nanopartículas núcleo-envoltura). Las nanoesferas, nanobarras y nanocopas son sólo algunas de las formas que han sido creadas. Los puntos cuánticos y los nanocristales semiconductores son ejemplos de tipos adicionales de nanopartículas. Dichas partículas de nanoescala, cuando se conjugan con un anticuerpo FOXC1, pueden utilizarse como agentes de formación de imágenes para la detección in vivo de células tumorales tal como se ha descrito anteriormente. En el presente documento también se describe que las nanopartículas pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas como vehículos fármacos que, cuando se conjugan con un anticuerpo o fragmento específico de PSCA de la presente invención, administran agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos, toxinas o cualquier otro agente citotóxico o agente anticancerígeno conocido en la técnica a células cancerosas que sobreexpresan PSCA sobre la superficie celular.

En el presente documento también se describe que cualquiera de los conjugados anti-FOXC1 descritos anteriormente puede conjugarse adicionalmente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, agentes de diagnóstico, nanopartículas, vehículos o una combinación de los mismos. Por ejemplo, un anticuerpo FOXC1 o fragmento de anticuerpo FOXC1 funcional puede radiomarcarse con ^{131}I y conjugarse con un vehículo lipídico, de manera que el conjugado anti-FOXC1-lípido forme una micela. La micela puede incorporar uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico. Alternativamente, además del vehículo, el anticuerpo FOXC1 o fragmento de anticuerpo FOXC1 funcional puede conjugarse a ^{131}I (por ejemplo, en un residuo de tirosina) y un fármaco (por ejemplo, en el grupo amino epsilon de un residuo de lisina) y el vehículo puede incorporar un agente terapéutico o de diagnóstico adicional.

Métodos para diagnosticar

Se puede utilizar un anticuerpo FOXC1 funcional tal como los descritos anteriormente para dirigirse a una célula positiva de FOXC1, como por ejemplo células de cáncer que expresan o sobreexpresan FOXC1. Se ha demostrado que la expresión de FOXC1 define subconjuntos agresivos biológicamente y clínicamente en varios tipos de cáncer y puede utilizarse tanto como biomarcador diagnóstico como pronóstico. FOXC1 es también un objetivo terapéutico adecuado para el cáncer, tal como se describe más adelante. Los cánceres que están asociados con la expresión de FOXC1 pueden incluir, pero no se limitan a, tumores cerebrales (como por ejemplo glioblastoma multiforme o astrocitoma), cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gástrico, leucemia, melanoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de próstata (como por ejemplo cáncer de próstata resistente a los andrógenos), cáncer de células renales y sarcomas (como por ejemplo sarcoma sinovial).

En particular, la expresión de FOXC1 es un biomarcador terapéutico importante que puede utilizarse para definir clínicamente, diagnosticar el pronóstico y tratar el cáncer de mama basal de tipo primario y metastásico y los subtipos basales similares relacionados. La relación entre la expresión de FOXC1 y su papel en el cáncer de mama de tipo basal se describe con detalle en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US10/44817, presentada el 6 de agosto de 2010. En pocas palabras, FOXC1 se eleva sólo en basal-como los subtipos moleculares de los cánceres de mama, y ha demostrado ser de alto significado pronóstico, ya que es predictivo de la alta mortalidad y la tasa de metástasis específicamente asociada con los cánceres de mama de tipo basal.

Por lo tanto, un anticuerpo FOXC1 de acuerdo con la reivindicación 1 se utiliza en métodos para diagnosticar, cáncer de mama basal de tipo primario y metastásico de acuerdo con la reivindicación 4. En una forma de realización, el anticuerpo FOXC1 es un anticuerpo monoclonal FOXC1 que se produce mediante una línea celular de hibridoma.

El anticuerpo FOXC1 descrito en el presente documento puede utilizarse para detectar células que expresan o sobreexpresan FOXC1. Esto se logra poniendo en contacto una o más células de cáncer de mama en una muestra biológica con el anticuerpo FOXC1 o fragmento de anticuerpo funcional. En algunas formas de realización, la muestra biológica puede ser por cualquier muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene células de cáncer de mama incluyendo, pero sin limitarse a tumores primarios o metastásicos, sangre, suero, plasma, linfa, ganglios linfáticos, líquido cefalorraquídeo, médula ósea, líquido intersticial y orina. En algunas formas de realización, la muestra biológica puede ser eliminada de un sujeto que tiene cáncer de mama o que se sospecha que tiene cáncer. En el presente documento también se describe que la muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene células de cáncer de mama puede ser retirada de un sujeto que tiene cáncer de mama o que se sospecha que tiene cáncer de mama. En los presentes métodos de diagnóstico, el anticuerpo FOXC1 se conjuga con un agente de diagnóstico para permitir detectar la presencia o ausencia de FOXC1 en las células de cáncer de mama. El agente diagnóstico puede ser cualquier sustancia radioactiva adecuada, colorantes, agente de contraste, compuesto o molécula fluorescente, compuesto o molécula bioluminiscente, enzima o agente potenciador descrito en detalle anteriormente o de otro modo conocido en la técnica. El conjugado anti-FOXC1 diagnóstico puede conjugarse o asociarse con una o más sustancias adicionales descritas en el presente documento, como por ejemplo lípidos vehículos o nanopartículas.

La detección de FOXC1 puede realizarse mediante cualquier método in vitro o in vivo adecuado. En una forma de realización, se realizará un inmunoensayo de diagnóstico in vitro para determinar el nivel de expresión de FOXC1 en una muestra de tejido que contiene células de cáncer (por ejemplo, células de cáncer de mama). La muestra de tejido puede tomarse de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer asociado con FOXC1 (por ejemplo, cáncer de mama) y se compara con una muestra de tejido normal (es decir, no canceroso) o una muestra de tejido de control (por ejemplo, una muestra de tejido benigno o canceroso conocido). En otras formas de realización, la muestra de tejido se puede analizar en cuanto a la presencia o ausencia de FOXC1.

La detección de la presencia o ausencia de FOXC1 o la detección de un nivel de expresión de FOXC1 en una muestra de tejido se lleva a cabo mediante cualquier inmunoensayo in vitro adecuado, como por ejemplo inmunohistoquímico, inmunocitoquímico, hibridación fluorescente in situ (FISH) u otras tinciones de inmunofluorescencia y transferencias de Western. Debido a que las membranas de plasma no son generalmente permeables a anticuerpos, proteínas, péptidos, fármacos y otras sustancias terapéuticas, los inmunoensayos in vitro que utilizan los contenidos de células enteras o preparaciones de células enteras (por ejemplo, inmunocitoquímica, tinción de inmunofluorescencia, transferencia de Western) deberían incluir una fase para el lisado o permeabilización de las células en la muestra de tejido para permitir que el anticuerpo FOXC1 o fragmento de anticuerpo funcional alcance su objetivo intracelular, FOXC1.

En otra forma de realización, el método de formación de imágenes puede incluir imagen de resonancia magnética (MRI), tomografía de emisión de positrones (PET) o microPET, tomografía computerizada (CT),

marcador de combinación PET/CT, dispositivo cargado acoplado refrigerado (CCD), imágenes ópticas de cámara, imágenes ópticas y tomografía computarizada de emisión de fotón simple (SPECT).

5 Las membranas de plasma celular generalmente no son permeables a anticuerpos, proteínas, péptidos, fármacos y otras sustancias terapéuticas. Por lo tanto, en algunos métodos de creación de imagen, el conjugado anti-FOXC1 diagnóstico debe administrarse de forma intracelular. De acuerdo con algunas formas de realización, el conjugado anti-FOXC1 puede administrarse intracelularmente por conjugación o asociación con un agente de administración intracelular o un vehículo. En una forma de realización, el agente o vehículo de administración puede incluir un péptido penetrante de células o un reactivo de administración. Los péptidos penetrantes de células que pueden usarse para formar un conjugado anti-FOXC1 para administración intracelular incluyen, pero no se limitan a, proteína TAT y proteína Pep-1. Otros agentes de administración que pueden utilizarse para suministrar el anticuerpo FOXC1 o el fragmento funcional que contiene incluyen, pero no se limitan a, nanopartículas, lípidos catiónicos, poli-L-arginina; fármacos liposómicos y vehículos poliméricos (por ejemplo, poli (ácido propil acrílico) (PPAA)). En otras formas de realización, el conjugado anti-FOXC1 puede administrarse intracelularmente mediante cualquier otro método adecuado, por ejemplo, terapia génica, administración de material genético a través de un vector viral, mediada por el receptor endocitosis y producción de intracuerpos.

20 Además de diagnosticar un cáncer asociado con la expresión de FOXC1, en el presente documento también se describe que el conjugado anti-FOXC1 también puede utilizarse para estadificar y monitorizar la progresión del cáncer de acuerdo con métodos que son similares a los descritos anteriormente.

Métodos para el tratamiento del cáncer

25 Aunque no entran dentro del ámbito de la invención tal como se reivindica, en el presente documento también se describen algunos métodos para tratar el cáncer u otras condiciones asociadas con la sobreexpresión de FOXC1. Tales métodos incluyen administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo FOXC1 o un fragmento de anticuerpo FOXC1 funcional tal como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo FOXC1 puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo funcional tal como se ha descrito con detalle anteriormente.

35 Cuando se administra un anticuerpo FOXC1 como parte de una composición farmacéutica, se debe administrar intracelularmente. Tal como se ha descrito anteriormente, la administración intracelular del anticuerpo FOXC1 puede realizarse por conjugación o asociación con un agente de administración intracelular o un vehículo o por cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, el anticuerpo FOXC1 o el fragmento funcional se puede conjugar con un agente de administración intracelular para permitir la administración del anticuerpo al citoplasma de las células.

40 "Tratar" o "tratamiento" de una afección puede referirse a prevenir la afección, retardar la aparición o tasa de desarrollo de la afección, reducir el riesgo de desarrollar la afección, prevenir o retrasar el desarrollo de los síntomas asociados con la afección, reducir o finalizar los síntomas asociados con la afección, generando una regresión completa o parcial de la enfermedad, o alguna combinación de los mismos.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "dosis terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un compuesto que produce un efecto terapéutico deseado en un sujeto, como por ejemplo prevenir o tratar una condición objetivo o aliviar los síntomas asociados con la afección. La cantidad terapéuticamente eficaz precisa es una cantidad de la composición que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto determinado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo pero no limitándose a las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo la edad, sexo, tipo y etapa de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada y tipo de medicamento), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación, y la vía de administración. Un experto en las técnicas clínicas y farmacológicas será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante la experimentación rutinaria, es decir, monitorizando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis en consecuencia. Para obtener orientación adicional, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21ª Edición, Univ. of Sciences in Philadelphia (USIP), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005.

60 La composición farmacéutica puede incluir un anticuerpo FOXC1, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo funcional por sí mismo o un conjugado terapéutico anti-FOXC1. El conjugado puede incluir un anticuerpo FOXC1, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo funcional conjugado con uno o más agentes terapéuticos tal como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo FOXC1 o un fragmento de anticuerpo FOXC1 funcional es un anticuerpo monoclonal FOXC1 producido por una línea celular de hibridoma y se une específicamente a una secuencia de péptidos antigénicos objetivo (por ejemplo, SEQ ID NO:2-3).

Un anticuerpo FOXC1, un anticuerpo modificado o un fragmento de anticuerpo funcional o un conjugado terapéutico anti-FOXC1 pueden conjugarse o asociarse con una o más sustancias adicionales descritas en la presente memoria, tales como conjugados anti-FOXC1 de diagnóstico (descritos anteriormente), agentes de diagnóstico no conjugados, soluciones de contraste, lípidos vehículos o nanopartículas.

La composición farmacéutica también puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que esté implicado en vehicular o transportar un compuesto de interés desde un tejido, órgano o parte del cuerpo a otro tejido, órgano o parte del cuerpo. Por ejemplo, el vehículo puede ser un relleno, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante líquido o sólido, o alguna combinación de los mismos. Cada componente del soporte debe ser "farmacéuticamente aceptable" en que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para el contacto con cualquier tejido, órgano o parte del cuerpo que pueda encontrar, lo que significa que no debe implicar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada. Una vía de administración puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a aerosol, enteral, nasal, oftálmica, oral, parenteral, rectal, transdérmica (por ejemplo, crema o ungüento tópico, parche) o vaginal. La administración "transdérmica" puede realizarse utilizando una crema tópica o una pomada o por medio de un parche transdérmico. "Parenteral" se refiere a una vía de administración que está generalmente asociada con inyección, incluyendo infraorbitaria, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardíaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoide, subcapsular, subcutánea, transmucosal o transtraqueal.

Ejemplo 1 Generación de un anticuerpo monoclonal FOXC1

Se generó un anticuerpo anti-FOXC1 tal como se describe a continuación.

Diseño de la secuencia de péptidos antigénicos. Se diseñó una secuencia de péptidos antigénicos utilizando la suite de software Lasergene de DNASTAR™. El software se utilizó para determinar las regiones de la proteína FOXC1 que maximizan la hidrofiliidad (H), la antigenicidad (A) y la probabilidad de superficie (SP), pero no contienen giros ni sitios de glicosilación. Además, se realizaron búsquedas BLAST contra bases de datos genéticas para asegurar que la homología de estos péptidos con otros genes de la familia FOX es baja. Basándose en los resultados del proceso de diseño descrito anteriormente, los residuos 51-75 de la proteína FOXC1 humana se seleccionaron como la secuencia de péptidos antigénicos tal como se muestra a continuación:

5'-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:2)

Se añadió un residuo de cisteína al terminal N (mostrado más abajo) para ayudar a la conjugación con la proteína vehículoa según sea necesario.

5'-C-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:3)

Esta secuencia peptídica antigénica se encuentra en el dominio de transactivación N-terminal FOXC1. Informes anteriores han sugerido que el dominio FOXC1 N-terminal juega un papel importante en la función de FOXC1 en la activación transcripcional (Berry et al., 2002). Por lo tanto, los anticuerpos FOXC1 que se unen específicamente a este dominio no sólo son útiles en ensayos diagnósticos y pronósticos, sino que son propensos a ser buenos candidatos para tratar cánceres de mama basales, así como otros cánceres que están asociados con la expresión o sobreexpresión de FOXC debido a que bloquean la actividad de FOXC1.

Producción de hibridomas y anticuerpos. La generación de hibridomas y anticuerpos se contrató a través de Pro-Sci Inc. En resumen, se inyectaron ratones Balb / c con la secuencia de antígeno de péptido FOXC1 descrita anteriormente para generar linfocitos que producen o son capaces de producir un anticuerpo monoclonal complementario. A continuación, se seleccionaron ratones inmunizados con altos títulos de respuesta de anticuerpos anti-FOXC1 y señales de inmunotransferencia positiva mediante ELISA e inmunotransferencia,

A continuación se generó la línea celular de hibridoma B2E3 fusionando células de mieloma con células B aisladas del bazo de los ratones inmunizados seleccionados. Después se utilizaron ELISA y inmunotransferencia para seleccionar los clones de células de hibridoma positivos, seguidos de dos subclonaciones consecutivas. Basándose en los resultados de inmunotransferencia, se expandieron en cultivo varios clones positivos que incluían la línea celular de hibridoma B2E3. Los anticuerpos producidos por los clones se purificaron usando una columna de purificación de IgG.

Los anticuerpos producidos por los hibridomas tal como se ha descrito anteriormente pueden utilizarse para la detección de la proteína FOXC1 y para acoplar otras moléculas a la proteína FOXC1. Además, se ensayó el anticuerpo anti-FOXC1 mediante inmunotransferencia, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica tal como se describe a continuación.

Inmunotransferencia. Se transfectaron células de cáncer de mama humano MCF-7 con vectores FOXC1 (+) o FOXC1 (-). Se generaron lisados de células enteras para transferencia Western por tampón de lisis celular (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 1%, glicerol al 10%) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma, St Louis, MO). Se separaron cantidades iguales de proteína mediante SDS-PAGE al 10% y a continuación se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los pasos restantes se llevaron a cabo de acuerdo con un protocolo estándar de inmunotransferencia (Qu et al., 2009). La inmunotransferencia se realizó con anticuerpos policlonales comerciales FOXC1 (Santa Cruz Biotechnology), y los anticuerpos monoclonales FOXC1 aislados de la línea celular de hibridoma B2E3. Después de la incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó de nuevo con PBST tres veces (5 min cada una) y luego se incubó con un anticuerpo secundario unido a la peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham, Piscataway, NJ) a una dilución de 1:4000 en una solución de bloqueo. La membrana se lavó y las bandas se visualizaron utilizando ensayos de quimioluminiscencia.

Tal como se muestra en la Figura 1, el anticuerpo monoclonal FOXC1 aislado a partir de la línea celular de hibridoma B2E3 produjo menos bandas no específicas en comparación con un anticuerpo policlonal comercial anti-FOXC1 de Santa Cruz Biotechnology Inc. Otros anticuerpos comerciales anti-FOXC1 disponibles producirían resultados similares o menos deseables en comparación con el anticuerpo anti-FOXC1 de Santa Cruz en términos de especificidad y sensibilidad. Por lo tanto, el anticuerpo FOXC1 descrito en el presente documento es más sensible y es superior como herramienta diagnóstica y pronóstica que los anticuerpos que se encuentran actualmente disponibles.

Coloración por inmunofluorescencia. Las células MCF-7 se transfectaron transitoriamente con el plásmido GFP-FOXC1 durante 24 h. A continuación, las células se digirieron con tripsina y se sembraron en portaobjetos de cámara (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) (Figura 2A). Después de 12 horas de incubación, las células se fijaron con formaldehído al 4% y a continuación se permeabilizaron con PBS que contenía 0.1% de Triton X-100. Los portaobjetos se bloquearon con BSA al 5% durante 30 minutos y se incubaron con un anticuerpo monoclonal primario FOXC1 aislado de la línea celular de hibridoma B2E3 a temperatura ambiente durante 1 h. Las células se incubaron después con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (1:200, Invitrogen) durante 30 min (Figura 2B). Los portaobjetos se lavaron con PBS tres veces durante 5 minutos cada uno, se montaron en DAPI y se observaron bajo un microscopio Nikon TI-E de alta resolución (Figura 2C). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 2.

Inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica (IHC) se realizó de acuerdo con protocolos estándar, con la excepción de: (1) la recuperación del antígeno se realizó durante 30 minutos a 100°C en tampón citrato (pH 6,0); (2) los anticuerpos anti-FOXC1 de ratón primario se hibridaron durante 16 horas a 4°C (durante la noche); y (3) el reactivo de marcado usado fue un anticuerpo anti-ratón basado en polímero (BioCare) con cromógeno DAB. La presencia de FOXC1 en tejidos de cáncer de mama (FOXC1+ y FOXC1-) tejidos se muestra en la Figura 3.

REFERENCIAS

- Berry FB, Saleem RA, Walter MA (2002). "FOXC1 transcriptional regulation is mediated by N- and C-terminal activation domains and contains a phosphorylated transcriptional inhibitory domain." J. Biol. Chem. 277 (12):10292-7.
- Chen BX, Erlanger BF, Intracellular delivery of monoclonal antibodies, Immunology Letters (2002) 84(1):63-67.
- Huson P.J. & Souriau C., Engineered Antibodies, Nature Medicine (2003) 9(1):129-134.
- Kameyama S, Horie M, Kikuchi T, Omura T, Takeuchi T, Nakase I, Sugiura Y and Futaki S, Bioconjugate Chem., 2006, 17, 597-602.
- Kohler, G. & Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497 (1975).
- Mie M, Takahashi F, Funabashi H, Yanagida Y, Aizawa M and Kobatake E, Intracellular delivery of antibodies using TAT fusion protein A (2003) 310(3):730-734.
- Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F and Divita G, Nat. Biotechnol., 2001, 19, 1 173-1 176.
- Nishimura DY, Swiderski RE, Alward WL, Searby CC, Patil SR, Bennet SR et al (1998). The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. Nat Genet 19: 140-7.
- Qu Y, Wang J, Sim MS, Liu B, Giuliano A, Barsoum J et al (2009). Elesclomol, counteracted by Akt survival signaling, enhances the apoptotic effect of chemotherapy drugs in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat.

Ray P, Wang J, Qu Y, Sim M, Shamonki J, Bagaria SP et al (2010). FOXC1 Is a Potential Prognostic Biomarker with Functional Significance in Basal-like Breast Cancer. Cancer Research May 15. Ray et al. 2010, Annals of Surgical Oncology, under review.

5 Ray P, Wang J, Qu Y, Sim M, Shamonki J, Bagaria SP et al (2010). FOXC1 Is a Potential Prognostic Biomarker with Functional Significance in Basal-like Breast Cancer. Cancer Research May 15.

Roth A, Drummond DC, Conrad F, Hayes ME, Kirpotin DB, Benz CC, Marks JD and Liu B, Anti-CD166 single chain antibody-mediated intracellular delivery of liposomal drugs to prostate cancer cells. Molecular Cancer Therapy 2007; 6(10):2737-46.

10 Stayton PS, El-Sayed ME, Murthy N, Bulmus V, Lackey C, Cheung C, Hoffman AS, 'Smart' delivery systems for biomolecular therapeutics, Orthod Craniofac Res. 2005; 8(3):219-25.

Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF: Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. Nat Med 2004, 10:310-315.

Weill CO, Biri S, Erbacher P, Cationic lipid-mediated intracellular delivery of antibodies into live cells. BioTechniques 44(7) vii-xi (2008).

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JOHN WAYNE CANCER INSTITUTE

Cui, Xiaojiang

<120> FOXC1 ANTIBODIES AND METHODS OF THEIR USE

<130> 79877.8002.WO00

<150> 61/439,825

<151> 2011-02-04

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 553

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<308> GenBank/AAH70124

<309> 2006-07-15

<313> (1)..(553)

<400> 1

20

ES 2 642 154 T3

Met Gln Ala Arg Tyr Ser Val Ser Ser Pro Asn Ser Leu Gly Val Val
 1 5 10 15

Pro Tyr Leu Gly Gly Glu Gln Ser Tyr Tyr Arg Ala Ala Ala Ala Ala
 20 25 30

Ala Gly Gly Gly Tyr Thr Ala Met Pro Ala Pro Met Ser Val Tyr Ser
 35 40 45

His Pro Ala His Ala Glu Gln Tyr Pro Gly Gly Met Ala Arg Ala Tyr
 50 55 60

Gly Pro Tyr Thr Pro Gln Pro Gln Pro Lys Asp Met Val Lys Pro Pro
 65 70 75 80

Tyr Ser Tyr Ile Ala Leu Ile Thr Met Ala Ile Gln Asn Ala Pro Asp
 85 90 95

Lys Lys Ile Thr Leu Asn Gly Ile Tyr Gln Phe Ile Met Asp Arg Phe
 100 105 110

Pro Phe Tyr Arg Asp Asn Lys Gln Gly Trp Gln Asn Ser Ile Arg His
 115 120 125

Asn Leu Ser Leu Asn Glu Cys Phe Val Lys Val Pro Arg Asp Asp Lys
 130 135 140

ES 2 642 154 T3

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

ES 2 642 154 T3

Ser Leu Tyr Ala Ala Gly Glu Arg Gly Gly His Leu Gln Gly Ala Pro
 405 410 415

Gly Gly Ala Gly Gly Ser Ala Val Asp Asn Pro Leu Pro Asp Tyr Ser
 420 425 430

Leu Pro Pro Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser His Gly Gly
 435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Glu Ala Gly His His Pro Ala
 450 455 460

Ala His Gln Gly Arg Leu Thr Ser Trp Tyr Leu Asn Gln Ala Gly Gly
 465 470 475 480

Asp Leu Gly His Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 485 490 495

Tyr Pro Gly Gln Gln Gln Asn Phe His Ser Val Arg Glu Met Phe Glu
 500 505 510

Ser Gln Arg Ile Gly Leu Asn Asn Ser Pro Val Asn Gly Asn Ser Ser
 515 520 525

Cys Gln Met Ala Phe Pro Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Arg Thr Ser Gly
 530 535 540

Ala Phe Val Tyr Asp Cys Ser Lys Phe
 545 550

<210> 2
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala His Ala Glu Gln Tyr Pro Gly Gly Met Ala Arg Ala Tyr Gly Pro
 1 5 10 15

Tyr Thr Pro Gln Pro Gln Pro Lys Asp
 20 25

<210> 3
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 642 154 T3

Ala His Ala Glu Gln Tyr Pro Gly Gly Met Ala Arg Ala Tyr Gly Pro
1 5 10 15

Tyr Thr Pro Gln Pro Gln Pro Lys Asp
 20 25

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo aislado que se une a una secuencia de péptidos antigénicos correspondiente al dominio de transactivación N-terminal de FOXC1 humano, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, en que la secuencia de péptidos antigénicos comprende los aminoácidos 51-75 de FOXC1 humano (SEQ ID NO:1), y en que el anticuerpo aislado se utiliza para detectar FOXC1 en un inmunoensayo in vitro.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en que el anticuerpo es producido por una línea celular de hibridoma.
3. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la secuencia peptídica antigénica es:
- 15 5'-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:2); o
 5'-C-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:3).
- 20 4. Un método in vitro para diagnosticar un cáncer de mama de tipo basal en un sujeto que tiene cáncer de mama o que se sospecha que tiene cáncer de mama, en que el método comprende:
- poner en contacto una o más células de cáncer de mama en una muestra biológica con un anticuerpo FOXC1 conjugado con un agente diagnóstico; en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, y en que el anticuerpo FOXC1 une una secuencia de péptidos antigénicos que corresponde al dominio de transactivación N-terminal del FOXC1 humano y que comprende aminoácidos 51-75 de FOXC1 humano (SEQ ID NO:1);
- 25 detectar la presencia o ausencia de FOXC1 en una o más células de cáncer de mama; y diagnosticar que el sujeto tiene un cáncer de mama de tipo basal cuando FOXC1 está presente.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en que la muestra biológica es una muestra tumoral primaria o metastásica, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de linfa, una muestra de ganglio linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de médula ósea, una muestra de fluido intersticial o una muestra de orina.
- 35 6. El método de la reivindicación 4, en que el agente de diagnóstico es una sustancia radiactiva, agente de contraste de colorantes, compuesto o molécula fluorescente, compuesto o molécula bioluminiscente, enzima o agente potenciador.
- 40 7. El método de la reivindicación 4, en que la detección de la presencia o ausencia de FOXC1 se logra mediante un inmunoensayo in vitro, en que el inmunoensayo in vitro se selecciona de forma opcional entre inmunocitoquímico (ICC), inmunohistoquímico (IHC), Western blot o hibridación fluorescente in situ (FISH).
- 45 8. El método de la reivindicación 7, que comprende además:
- lisado o permeabilización de una o más células de cáncer de mama cuando el inmunoensayo in vitro utiliza el contenido de células enteras o preparaciones de células enteras.
- 50 9. El método de la reivindicación 4, en que el anticuerpo FOXC1 se conjuga con un agente de administración intracelular.
- 55 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en que la secuencia de péptidos antigénicos es:
- 5'-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:2); o
 5'-C-AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKD-3' (SEQ ID NO:3).
- 60

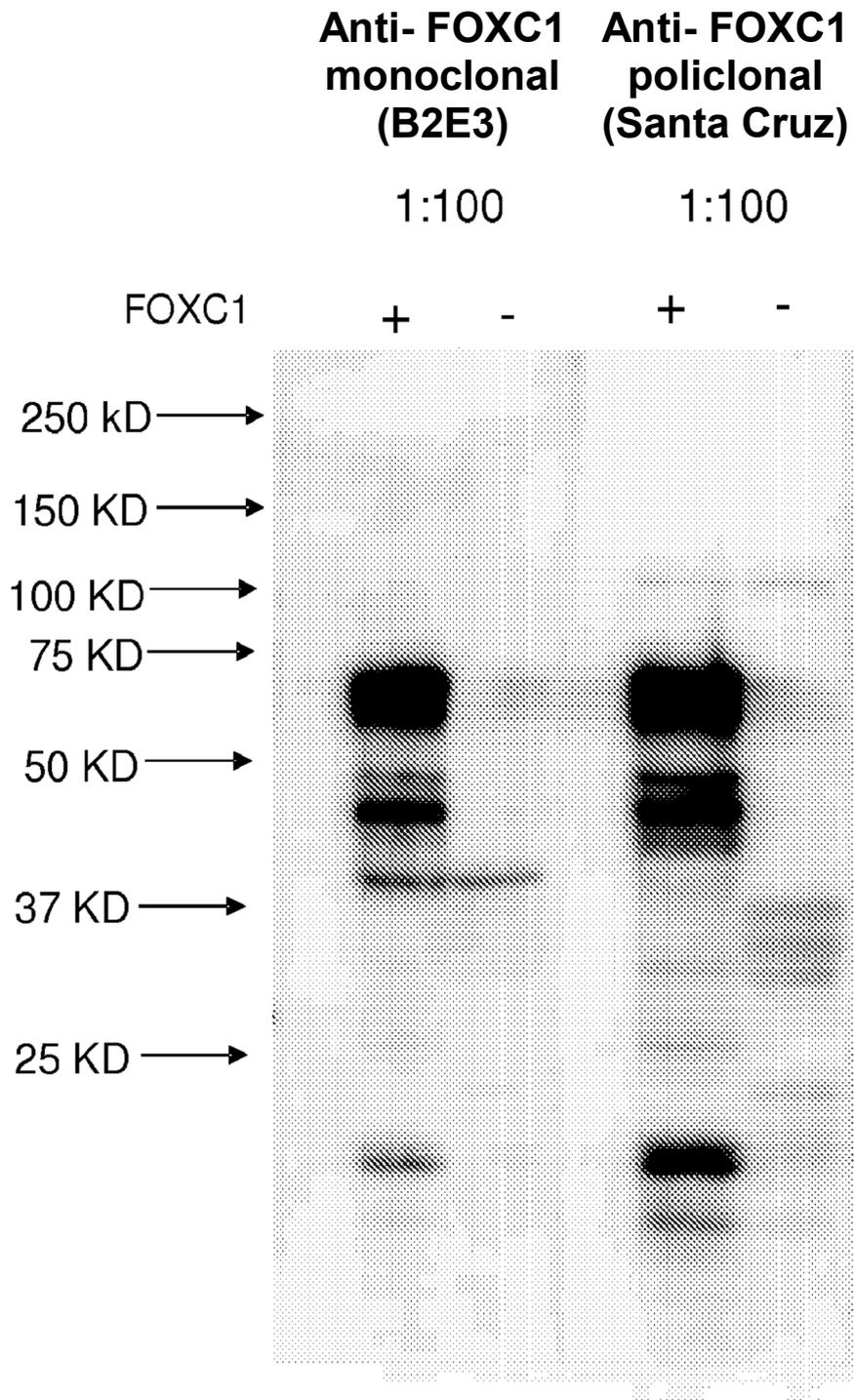
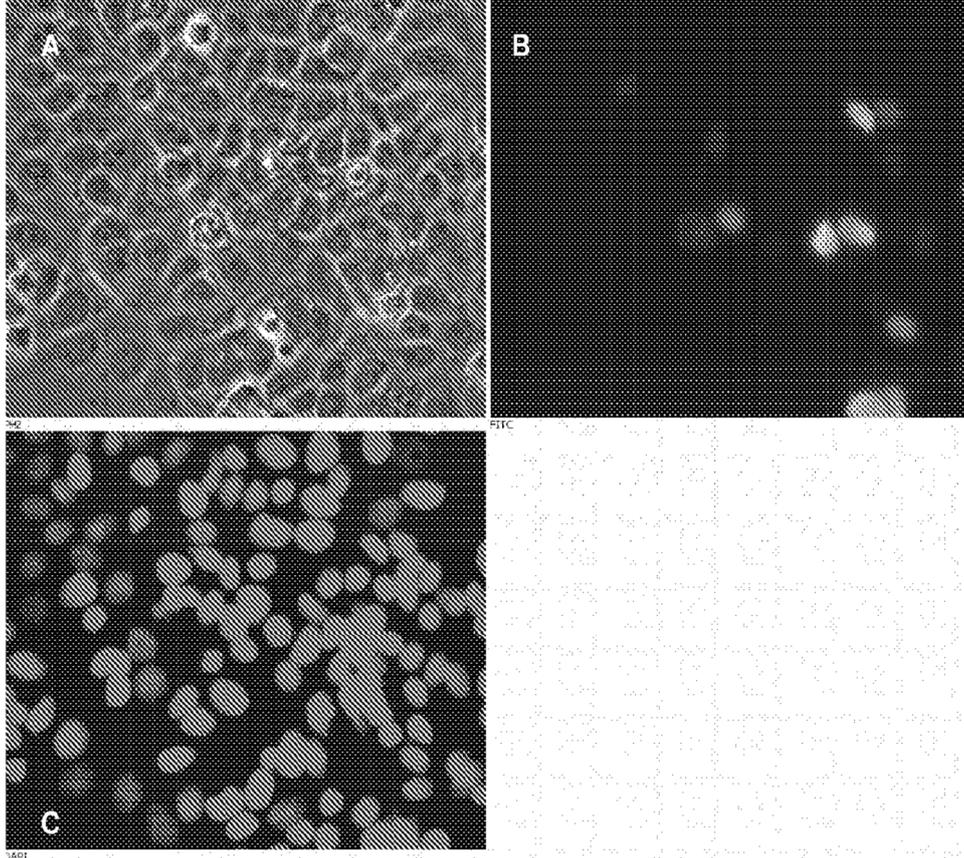


Figura 1

Contraste de Fases

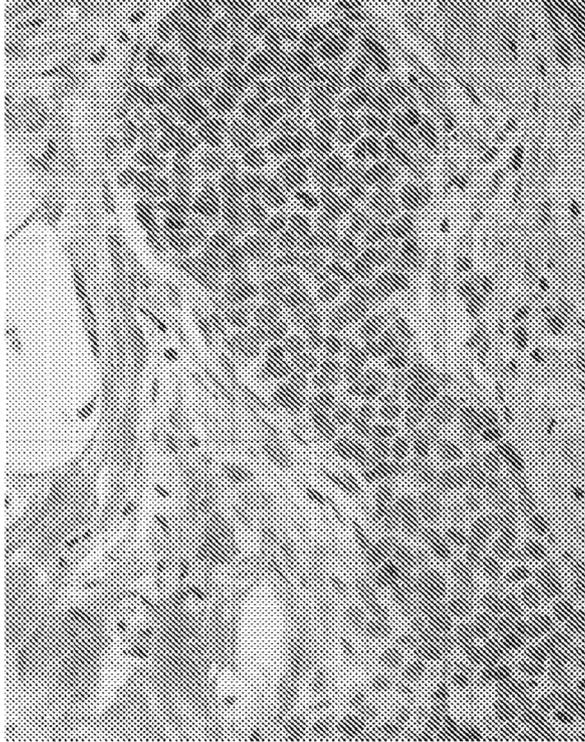
Anti- FOXC1 monoclonal



DAPI

Figura 2

FOXC1 negativo



FOXC1 positivo

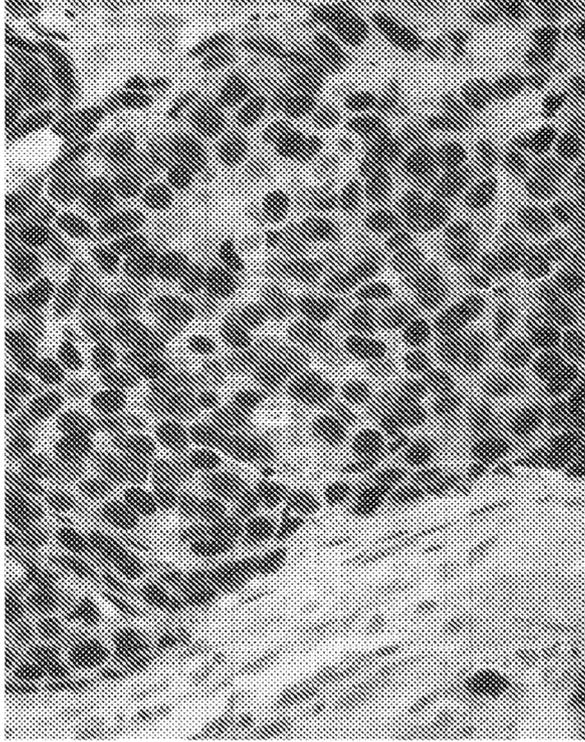


Figura 3

Figura 4: Secuencia de Aminoácidos de FOXC1 humano (SEQ ID NO:1)

MQARYSVSSPNSLGVVPYLGGEQSYRAAAAAAGGGYTAMPAPMSVYSHP
 10 20 30 40 50
AHAEQYPGGMARAYGPYTPQPQPKDMVKPPYSYIALITMAIQNAPDKKIT
 60 70 80 90 100
 LNGIYQFIMDRFPFYRDNKQGWQNSIRHNLSLNECFVKVPRDDKKPGKGS
 110 120 130 140 150
 YWTLDPDSYNMFENGSLRRRRRFKKKDAVKDKEEKDRHLHLKEPPPPGRQ
 160 170 180 190 200
 PPPAPPEQADGNAPGPQPPVRIQDIKTENGTCPSPQPPLSPAALGSGS
 210 220 230 240 250
 AAAPVKIESPDSSSSSLSSGSSPPGSLPSARPLSLDGADSAPPPPAPSAP
 260 270 280 290 300
 PPHSQGFSDNIMTSLRGSPQSAAAELSSGLLASAAAASSRAGIAPPLAL
 310 320 330 340 350
 GAYSPGQSSLYSSPCSQTSSAGSSGGGGGAGAAGGAGGAGTYHCNLQAM
 360 370 380 390 400
 SLYAAGERGGHLQGAPGGAGGSAVDNPLPDYSLPPVTSSSSSSLSHGSGG
 410 420 430 440 450
 GGGGGQGEAGHHPAAHQRLTSWYLNQAGGDLGHLASAAAAAAGYPGQ
 460 470 480 490 500
 QQNFHSVREMFESQRIGLNNSPVNGNSSCQMAFPSSQSLYRTSGAFVYDC
 510 520 530 540 550
 SKF