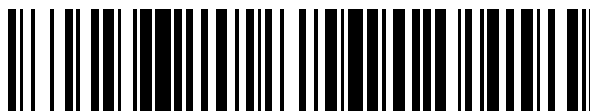


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 201**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014** **PCT/EP2014/071204**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015** **WO15049355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014** **E 14777674 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 3036259**

54 Título: **Anticuerpos que se unen específicamente a HER3**

30 Prioridad:

04.10.2013 EP 13004801

18.10.2013 EP 13005008

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

24.05.2018

73 Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (33.3%)

Sandhofer Straße 116

68305 Mannheim, DE;

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (33.3%) y

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (33.3%)

72 Inventor/es:

SOUKUPOVA, MONIKA;

SCHRAEML, MICHAEL;

BOSENMAIER, BIRGIT;

ROCHE, PATRICK C.;

GERG, MICHAEL y

DZIADEK, SEBASTIAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 669 201 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 que se unen específicamente a HER3

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos aislados que se unen específicamente a HER3 humano, a métodos para realizar inmunohistoquímica usando estos anticuerpos y a métodos para su producción.

Antecedentes de la invención

- 10 HER3 humano (ErbB-3, ERBB3, c-erbB-3, c-erbB3, tirosina-proteína cinasa receptora erbB-3, SEQ ID NO: 17) codifica para un miembro de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de tirosina cinasas receptoras que también incluye HER1 (también conocido como EGFR), HER2 y HER4 (Kraus, M.H. *et al.*, PNAS 86 (1989) 9193-9197; Plowman, G.D. *et al.*, PNAS 87 (1990) 4905-4909; Kraus, M.H. *et al.*, PNAS 90 (1993) 2900-2904). Como el receptor de factor de crecimiento epidérmico prototípico, el receptor transmembrana HER3 consiste en un dominio de unión a ligando extracelular (ECD), un dominio de dimerización con el ECD, un dominio transmembrana, un dominio proteína tirosina cinasa (TKD) intracelular y un dominio de fosforilación C-terminal. Esta proteína trans-membrana tiene un dominio de unión a heregulina (HRG) dentro del dominio extracelular pero no un dominio cinasa activo. Por tanto, puede unirse a este ligando pero no transmite la señal al interior de la célula a través de fosforilación de proteínas. Sin embargo, forma heterodímeros con otros miembros de la familia de HER que tienen actividad cinasa. La heterodimerización conduce a la activación de la ruta de señalización mediada por receptor y a la transfosforilación de su dominio intracelular. La formación de dímeros entre miembros de la familia de HER expande el potencial de señalización de HER3 y es un medio no sólo para la diversificación de la señal sino también para la amplificación de la señal. Por ejemplo, el heterodímero HER2/HER3 induce una de las señales mitogénicas más importantes por medio de la ruta de PI3K y AKT entre miembros de la familia de HER (Sliwkowski M.X., *et al.*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 14661-14665; Alimandi M, *et al.*, Oncogene. 10 (1995) 1813-1821; Hellyer, N.J., J. Biol. Chem. 276 (2001) 42153-4261; Singer, E., J. Biol. Chem. 276 (2001) 44266-44274; Schaefer, K.L., Neoplasia 8 (2006) 613-622).

- 15 La amplificación de este gen y/o la sobreexpresión de su proteína se han notificado en numerosos cánceres, incluyendo tumores de próstata, vejiga y mama. Se han caracterizado variantes de corte y empalme transcripcionales alternativas que codifican para diferentes isoformas.

- 20 Una isoforma carece de la región intermembrana y se secreta fuera de la célula. Esta forma actúa modulando la actividad de la forma unida a la membrana. Se han notificado también variantes de corte y empalme adicionales, pero no se han caracterizado a fondo.

- 25 A pesar del hecho de que se conoce HER3 humano desde hace más de veinte años, ha sido e incluso hoy en día es extremadamente difícil detectar la proteína HER3 en una muestra de tejido. Sin embargo, la detección de HER3 en una muestra de tejido es crucial para correlacionar la estructura y morfología de una muestra dada con la localización, la distribución tisular y/o la concentración de HER3 con respecto a una función biológica, en particular con respecto a un contexto fisiopatológico relacionado con numerosos cánceres.

- 30 Se conocen en la técnica anticuerpos frente a HER3. El documento WO 2012/031198 A2 se refiere a proteínas de unión a antígeno, tales como anticuerpos, que se unen a HER3, así como a productos relacionados y a usos de los mismos. El documento WO 2010/083470 A1 da a conocer métodos de medición y/o cuantificación de la presencia y/o cantidad de HER3 y/o HER3 en un complejo en una muestra y anticuerpos específicos para HER3. El documento EP 2138511 A1 se refiere a un inhibidor de HER3 para el tratamiento de melanoma, a composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de este tipo y a un método para el diagnóstico o pronóstico de melanoma y da a conocer un anticuerpo frente a HER3.

- 35 Aunque están disponibles varios anticuerpos anti-HER3 como reactivos de investigación de diversas empresas, no parecería que fuera posible una tinción satisfactoria de una muestra de tejido, especialmente de una muestra de tejido que se ha fijado con formalina y incrustado en parafina usando esos reactivos. En particular existe la necesidad de anticuerpos que muestren una alta especificidad de unión y sensibilidad hacia HER3 cuando se usen en sistemas de tinción automatizados para muestras de tejido tales como Benchmark XT de Ventana.

Fue la tarea de la presente invención identificar un anticuerpo que se une específicamente a la proteína HER3 humana y que puede al menos superar parcialmente los problemas conocidos en la técnica.

Sumario de la invención

- 40 La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, o a una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano, en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una región CDR2H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y una región CDR3H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1L que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una región CDR2L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 y una región CDR3L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, en el que SEQ ID NO: 2 se combina con SEQ ID NO: 6 y en el que SEQ ID NO: 3 se combina con SEQ ID NO: 7.

La presente invención comprende además un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano, y (i) que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o (ii) que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. La presente descripción también comprende un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano y que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende una región CDR1H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 1 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, una región CDR2H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 2 o modificada a partir de SEQ ID NO: 3 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y una región CDR3H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 4 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1L que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 5 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, una región CDR2L que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 6 o modificada a partir de SEQ ID NO: 7 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y una región CDR3L que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. La región CDR1L puede comprender una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 5 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 5. La sustitución de aminoácido conservativa en la posición 5 de SEQ ID NO: 5 puede ser una sustitución de treonina/serina. La región CDR3L puede comprender una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 o la posición 9, o la región CDR3L puede comprender una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 y la posición 9. La sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 de SEQ ID NO: 8 puede ser una sustitución de valina/alanina o la sustitución de aminoácido conservativa en la posición 9 de SEQ ID NO: 8 puede ser una sustitución de alanina/treonina. La región CDR3L puede comprender una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 y la posición 9, en la que la sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 de SEQ ID NO: 8 es una sustitución de valina/alanina y la sustitución de aminoácido conservativa en la posición 9 de SEQ ID NO: 8 es una sustitución de alanina/treonina.

En una realización preferida, el anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano, se define como en la reivindicación 1, y comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y un dominio variable de cadena ligera con una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

En una realización el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal.

En otra realización el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de la subclase IgG.

Se ha encontrado sorprendentemente que cualquiera de los anticuerpos de la presente invención mencionados anteriormente tienen propiedades bastante ventajosas y pueden superar al menos algunos de los problemas conocidos en la técnica. Pueden usarse con gran ventaja en un procedimiento de tinción inmunohistológica para detectar la proteína HER3 humana. Es especialmente sorprendente y digno de mención que los anticuerpos según la presente invención producen excelentes resultados de tinción incluso con una muestra de tejido fijado con formalina incrustado en parafina (FFPET). Como tales, los anticuerpos según la presente invención son particularmente útiles para la detección de HER3 humano en muestras de FFPET procesadas en procedimientos de tinción automatizados.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para realizar inmunohistoquímica, comprendiendo el método las etapas de incubar una muestra de tejido con un anticuerpo según la presente invención, mediante lo cual tiene lugar la unión de dicho anticuerpo a HER3 humano en dicho tejido y teñir dicha muestra de tejido para el anticuerpo anti-HER3 unido a la muestra de tejido.

En una realización la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo según la presente invención en la detección inmunohistoquímica de HER3 humano, especialmente en una muestra de tejido fijado con formaldehído incrustado en parafina (FFPET).

Otra realización de la presente invención se refiere a kits útiles para facilitar la práctica de una detección inmunohistoquímica de HER3 humano. En una realización, se proporciona un kit para la detección de HER3 humano

en una muestra de tejido fijado con formaldehído incrustado en parafina (FFPET), comprendiendo dicho kit un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, según la invención, y reactivos para la detección de dicho anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo.

- 5 Otro aspecto de la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo anti-HER3 proporcionado en el presente documento.

En una realización el ácido nucleico codifica para la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-HER3, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR1H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una región CDR2H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y una región CDR3H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR1L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una región CDR2L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 y una región CDR3L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, en el que SEQ ID NO: 2 se combina con SEQ ID NO: 6 y en el que SEQ ID NO: 3 se combina con SEQ ID NO: 7.

También se describe un ácido nucleico que codifica la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-HER3, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR1H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 1 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, una región CDR2H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y una región CDR3H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 4 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR1L que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 5 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, una región CDR2L que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y una región CDR3L o que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

En una realización adicional el ácido nucleico codifica para la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-HER3, en el que (i) el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o (ii) el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

En otra realización el ácido nucleico tal como se define en las reivindicaciones codifica para la cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-HER3, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

La invención comprende además un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la invención para la expresión de un anticuerpo según la invención en una célula huésped procariota o eucariota.

La invención comprende además una célula huésped procariota o eucariota que comprende un vector según la invención.

La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo recombinante según la invención, caracterizado por expresar un ácido nucleico según la invención en una célula huésped procariota o eucariota y recuperar dicho anticuerpo de dicha célula o el sobrenadante de cultivo celular.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano, caracterizado porque el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR1H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una región CDR2H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y una región CDR3H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR1L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una región CDR2L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 y una región CDR3L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, en el que SEQ ID NO: 2 se combina con SEQ ID NO: 6 y en el que SEQ ID NO: 3 se combina con SEQ ID NO: 7.

La presente invención comprende además un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano, caracterizado porque (i) el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o (ii) el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:

10 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

La descripción también comprende un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano, caracterizado porque el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR1H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 1 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en posiciones, una región CDR2H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y una región CDR3H que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 4 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1L que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 5 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, una región CDR2L que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y una región CDR3L o que comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

En una realización preferida, un anticuerpo aislado que se une a HER3 humano, se define como en la reivindicación 1 y se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos el 95% con SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

En una realización el anticuerpo según la presente invención es monoclonal.

En otra realización el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de la subclase IgG.

A menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención dada a conocer en el presente documento.

Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un anticuerpo” significa un anticuerpo o más de un anticuerpo.

El término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

El término “porción de unión a antígeno de un anticuerpo” cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La porción de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos de aminoácido de las CDR. El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo de la invención contiene seis CDR que pueden contribuir a grados variables a la afinidad del sitio de unión por el antígeno. Hay tres CDR de dominio variable de cadena pesada (CDR1H, CDR2H y CDR3H) y tres CDR de dominio variable de cadena ligera (CDR1L, CDR2L y CDR3L). El término “CDR1H” indica la región CDR1 de la región variable de cadena pesada calculada según Kabat. CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L y CDR3L significan las regiones respectivas de la cadena pesada (H) o ligera (L). La extensión de CDR y FR se determina mediante comparación con una base de datos compilada de secuencias de aminoácidos en la que esas regiones se han definido según la variabilidad entre las secuencias según Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. Un “anticuerpo aislado”, tal como se usa en el presente documento, también pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a HER3 humano está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de HER3 humano). Sin embargo un anticuerpo aislado que se une específicamente a HER3 humano puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de HER3 de otras especies. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica

hasta más del 70% en peso de anticuerpo tal como se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más del 80%, el 90, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% en peso. En una realización preferida el anticuerpo aislado según la presente invención se purifica hasta más del 90% de pureza tal como se determina mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras usando tinción con azul de Coomassie para la detección de proteínas.

En la técnica están bien establecidos métodos de generación de anticuerpos (tales como anticuerpos monoclonales o policlonales) (por ejemplo, véase Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988). Por ejemplo pueden conjugarse fragmentos peptídicos de HER3 humano con moléculas portadoras (o ácidos nucleicos que codifican para tales epítomos o RDP conjugados) y pueden inyectarse en mamíferos no humanos (tales como ratones o conejos), seguido por inyecciones de refuerzo, para producir una respuesta de anticuerpos. Puede aislarse suero de animales inmunizados para los anticuerpos policlonales contenidos en el mismo, o pueden usarse bazo de animales inmunizados para la producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales. En algunos ejemplos, los anticuerpos se purifican antes de su uso.

Un anticuerpo policlonal que se une a HER3 humano puede obtenerse, por ejemplo, mediante inmunoabsorción usando una columna de afinidad que contiene esta secuencia como material inmunosorbente. En el caso de que el anticuerpo aislado sea un anticuerpo monoclonal, tal anticuerpo en algunas realizaciones se purifica (1) hasta más del 90% de anticuerpo tal como se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más del 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinte de plata o azul de Coomassie.

En un ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a HER3 humano puede prepararse a partir de hibridomas murinos según el método clásico de Kohler y Milstein (*Nature*, 256:495, 1975) o métodos derivados del mismo. En resumen, se inocula repetitivamente un ratón (tal como Balb/c) con unos cuantos microgramos de un fragmento de péptido de HER3 humano o conjugado portador del mismo a lo largo de un periodo de unas cuantas semanas. Entonces se sacrifica el ratón, y se aíslan las células productoras de anticuerpos del bazo. Las células del bazo se fusionan por medio de polietilenglicol con células de mieloma de ratón, y el exceso de células no fusionadas se destruye mediante el crecimiento del sistema sobre medios selectivos que comprenden aminopterina (medios HAT). Las células fusionadas satisfactoriamente se diluyen y se colocan alícuotas de la dilución en pocillos de una placa de microtitulación en donde continúa el crecimiento del cultivo. Se identifican clones productores de anticuerpos mediante la detección de anticuerpos en el fluido sobrenadante de los pocillos mediante procedimientos de inmunoensayo, tales como ELISA, tal como describió originalmente Engvall (*Enzymol.*, 70:419, 1980), y métodos derivados del mismo. Pueden expandirse clones positivos seleccionados y recogerse su producto de anticuerpo monoclonal para su uso.

Si un anticuerpo se une a HER3 humano se evalúa fácilmente mediante un inmunoensayo apropiado. En un modo preferido un péptido de HER3 humano se marca de manera N o C-terminal con biotina. Un agente de marcaje preferido es usar Fmoc-Glu(biotinil-PEG)-OH, que incorpora un espaciador flexible, hidrófilo entre el residuo de biotina y la cadena peptídica. El péptido biotinilado se une a una fase sólida recubierta con un reactivo de unión a biotina, por ejemplo, por medio de estreptavidina. Si un anticuerpo que va a analizarse contiene un sitio de unión a un epítipo dentro del péptido de HER3 humano, tal anticuerpo se une al péptido y puede detectarse por cualquier medio apropiado.

El anticuerpo según la presente invención que se une a HER3 humano tiene preferiblemente al menos una afinidad de unión de 10^7 l/mol por esta molécula. También preferido, tiene una afinidad de 10^8 l/mol o mejor o de 10^9 l/mol o mejor.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “que se une a HER3 humano”, “que se une específicamente a HER3 humano” o “anticuerpo anti-HER3” son intercambiables y se refieren a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno HER3 humano. Tal como apreciará el experto en la técnica el término “específico” o “que se une específicamente” se usa para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al anticuerpo que se une (específicamente) a HER3 humano. Sin embargo, el anticuerpo que se une específicamente a HER3 humano puede tener reactividad cruzada con moléculas de HER3 de otras especies. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de HER3 humano en una muestra que contiene HER3 humano da como resultado una afinidad de unión que es de sólo el 10% o menos, más preferiblemente sólo el 5% o menos de la afinidad por HER3 humano, respectivamente. El anticuerpo que se une específicamente a HER3 humano, por ejemplo, no se unirá a HER2 humano u otros homólogos cercanos, es decir, tiene una afinidad de unión por el mismo que es al menos 10 veces o preferido al menos 20 veces peor que la afinidad de unión por HER3 humano.

HER3 humano (ErbB-3, ERBB3, c-erbB-3, c-erbB3, tirosina-proteína cinasa receptora erbB-3, SEQ ID NO: 17) codifica para un miembro de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de tirosina cinasas receptoras que también incluye HER1 (también conocido como EGFR), HER2 y HER4 (Kraus, M.H. *et al.*, PNAS 86

(1989) 9193-9197; Plowman, G.D. *et al.*, PNAS 87 (1990) 4905-4909; Kraus, M.H. *et al.*, PNAS 90 (1993) 2900-2904). La secuencia de aminoácidos de HER3 humano aparece en la secuencia de aminoácidos tal como se indica en el presente documento en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot con la secuencia de referencia n.º P21860. Como el receptor de factor de crecimiento epidérmico prototípico, el receptor transmembrana HER3 consiste en un dominio de unión a ligando extracelular (ECD), un dominio de dimerización dentro del ECD, un dominio transmembrana, un dominio proteína tirosina cinasa (TKD) intracelular y un dominio de fosforilación C-terminal. Esta proteína unida a la membrana tiene HER3, un dominio de unión a heregulina (HRG) dentro del dominio extracelular pero no un dominio cinasa activo. Por tanto, puede unirse a este ligando pero no transmitir la señal al interior de la célula a través de fosforilación de proteínas. Sin embargo, forma heterodímeros con otros miembros de la familia de HER que tienen actividad cinasa. La heterodimerización conduce a la activación de la ruta de señalización mediada por receptor y a la transfosforilación de su dominio intracelular. La formación de dímeros entre miembros de la familia de HER expande el potencial de señalización de HER3 y es un medio no sólo para la diversificación de la señal sino también para la amplificación de la señal. Por ejemplo, el heterodímero HER2/HER3 induce una de las señales mitogénicas más importantes por medio de la ruta de PI3K y AKT entre miembros de la familia de HER (Sliwkowski M.X., *et al.*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 14661-14665; Alimandi M, *et al.*, Oncogene. 10 (1995) 1813-1821; Hellyer, N.J., J. Biol. Chem. 276 (2001) 42153-4261; Singer, E., J. Biol. Chem. 276 (2001) 44266-44274; Schaefer, K.L., Neoplasia 8 (2006) 613-622).

La amplificación de este gen y/o la sobreexpresión de su proteína se han notificado en numerosos cánceres, incluyendo tumores de próstata, vejiga y mama. Se han caracterizado variantes de corte y empalme transcripcionales alternativas que codifican para diferentes isoformas.

Una isoforma carece de la región intermembrana y se secreta fuera de la célula. Esta forma actúa modulando la actividad de la forma unida a la membrana. También se han notificado variantes de corte y empalme adicionales, pero no se han caracterizado a fondo.

Un anticuerpo según la presente invención se une a la región intracelular de Her3 y por tanto sólo detecta la isoforma unida a la membrana de HER3 humano y no la isoforma secretada.

Tal como se describió anteriormente, los anticuerpos según la presente invención, es decir, que se unen a HER3 humano pueden aislarse, por ejemplo, del suero de un animal inmunizado mediante inmunoadsorción usando un péptido de HER3 humano.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales con calidad constante y en cantidad casi ilimitada. En una realización preferida el anticuerpo según la invención es un anticuerpo monoclonal.

Dos de los mejores anticuerpos monoclonales generados tienen CDR similares y pueden usarse sorprendentemente para una detección fiable de HER3 humano en muestras de tejido, especialmente en sistemas de tinción automáticos para muestras de FFPET.

En un aspecto, un anticuerpo anti-HER3 según la invención comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. En determinadas realizaciones, una secuencia de VH que tiene una identidad de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti HER3 que comprende esa secuencia conserva la capacidad para unirse a HER3. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o deleccionado en SEQ ID NO: 9 o en SEQ ID NO: 10. En determinadas realizaciones, se producen sustituciones, inserciones o deleciones en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-HER3 comprende secuencia de VH en SEQ ID NO: 9 o en SEQ ID NO: 10, incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. Sin embargo, la VH comprende tres CDR, concretamente (a) CDR1H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (b) CDR2H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 y (c) CDR3H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en la que en el anticuerpo SEQ ID NO: 2 se combina con SEQ ID NO: 6 y en la que SEQ ID NO: 3 se combina con SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 según la invención comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12. En determinadas realizaciones, una secuencia de VL que tiene una identidad de al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones, o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-HER3 que comprende esa secuencia conserva la capacidad para unirse a HER3. En determinadas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o deleccionado en SEQ ID NO: 11 o en SEQ ID NO: 12. En determinadas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las CDR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-HER3 comprende la secuencia de VL en SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12,

incluyendo modificaciones postraduccionales de esa secuencia. Sin embargo, la VL comprende tres CDR, concretamente (a) CDR1L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (b) CDR2L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7; y (c) CDR3L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, en la que en el anticuerpo SEQ ID NO: 2 se combina con SEQ ID NO: 6 y en la que SEQ ID NO: 3 se combina con SEQ ID NO: 7.

En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL (i) en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11 o (ii) en SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 incluyendo modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

El término “aminoácido” tal como se usa dentro de esta solicitud indica el grupo de carboxi-a-aminoácidos que se producen de manera natural que comprende alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gin, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

También se describen anticuerpos que incluyen, además, tales anticuerpos que tienen “modificaciones de secuencia conservativas” (anticuerpos variantes), modificaciones en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos que no afectan ni alteran las características mencionadas anteriormente del anticuerpo según la invención. Pueden introducirse modificaciones mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR o puede introducirse una mutación mediante síntesis de genes sintéticos *de novo*. Tal como se usan en el presente documento, los términos “sustitución de aminoácido conservativa”, “sustitución conservativa” o “modificación de secuencia conservativa” son intercambiables y se refieren a una sustitución de aminoácido, en la que se reemplaza un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo humano anti-HER3 puede reemplazarse preferiblemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En la tabla 1 se muestran sustituciones de aminoácidos conservativas a modo de ejemplo.

Tabla 1 - Sustituciones de aminoácidos conservativas a modo de ejemplo

Residuo original	Sustituciones muy altamente conservadas	Sustituciones altamente conservadas (a partir de la matriz Blosum90)	Sustituciones conservadas (a partir de la matriz Blosum65)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gln, His, Lys	Asn, Gln, Glu, His, Lys
Asn	Gln; His	Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gln, Glu, Ser
Cys	Ser	Ninguna	Ala
Gln	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser
Glu	Asp	Asp, Gln, Lys	Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser
Gly	Pro	Ala	Ala, Ser
His	Asn; Gln	Arg, Asn, Gln, Tyr	Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr
Ile	Leu; Val	Leu, Met, Val	Leu, Met, Phe, Val
Leu	Ile; Val	Ile, Met, Phe, Val	Ile, Met, Phe, Val
Lys	Arg; Gln; Glu	Arg, Asn, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu, Ser,
Met	Leu; Ile	Gln, Ile, Leu, Val	Gln, Ile, Leu, Phe, Val
Phe	Met; Leu; Tyr	Leu, Trp, Tyr	Ile, Leu, Met, Trp, Tyr
Ser	Thr	Ala, Asn, Thr	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Ser	Ala, Asn, Ser, Val
Trp	Tyr	Phe, Tyr	Phe, Tyr
Tyr	Trp; Phe	His, Phe, Trp	His, Phe, Trp

Val	Ile; Leu	Ile, Leu, Met	Ala, Ile, Leu, Met, Thr
-----	----------	---------------	-------------------------

Un anticuerpo anti-HER3 “variante” se refiere por tanto en el presente documento a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo anti-HER3 “original” en hasta diez, preferiblemente desde aproximadamente dos hasta aproximadamente cinco, adiciones, delecciones y/o sustituciones en una o más regiones variables del anticuerpo original. Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse mediante mutagénesis basándose en modelado molecular tal como describen Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

También se describe un anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3, y en el que la región CDR1L comprende una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 5 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 5. La sustitución de aminoácido conservativa en la posición 5 de SEQ ID NO: 5 puede ser una sustitución de treonina/serina. El término “sustitución de treonina/serina” tal como se usa en el presente documento significa que el aminoácido treonina en una variante del anticuerpo anti-HER3 se reemplaza por serina, o viceversa, la serina en una variante del anticuerpo anti-HER3 se reemplaza por treonina. Lo mismo se aplica a otras sustituciones de aminoácidos específicos en anticuerpos anti-HER3 “variantes”. Por ejemplo, en otro anticuerpo aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3, la región CDR3L puede comprender una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 o la posición 9, o la región CDR3L puede comprender una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 y la posición 9. La sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 de SEQ ID NO: 8 puede ser una sustitución de valina/alanina o la sustitución de aminoácido conservativa en la posición 9 de SEQ ID NO: 8 puede ser una sustitución de alanina/treonina. La región CDR3L puede comprender una secuencia de aminoácidos modificada a partir de SEQ ID NO: 8 mediante una sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 y la posición 9, en la que la sustitución de aminoácido conservativa en la posición 6 de SEQ ID NO: 8 es una sustitución de valina/alanina y la sustitución de aminoácido conservativa en la posición 9 de SEQ ID NO: 8 es una sustitución de alanina/treonina.

Los anticuerpos según la presente invención han demostrado ser extremadamente útiles en la detección inmunohistoquímica de HER3 humano. En una realización la presente invención se refiere a un método para realizar inmunohistoquímica (IHC), comprendiendo el método las etapas de a) incubar una muestra de tejido con un anticuerpo según la presente invención, mediante lo cual tiene lugar la unión de dicho anticuerpo a HER3 humano en dicho tejido y b) teñir dicha muestra de tejido para el anticuerpo anti-HER3 unido en la etapa a).

El término “tinte” usado como nombre o el término “reactivo de tinción” se refiere a compuestos biológicos o químicos, y a composiciones que contienen tales compuestos que, cuando se aplican a moléculas seleccionadas como diana en muestras biológicas, hacen que las moléculas sean detectables (por ejemplo, bajo examen microscópico). Las tinciones incluyen sin limitación sondas de ácido nucleico detectables, anticuerpos y otros reactivos que en combinación o por sí mismos dan como resultado un producto final detectable. El término “tinte” se usa de manera intercambiable con el término “colorante”. El término “tinte” usado como verbo, o el término “teñir”, significa el contacto de una muestra biológica con un reactivo, tinte o colorante de tinción.

Para la inmunotinción satisfactoria de un antígeno en una muestra de tejido o células tienen que cumplirse al menos tres criterios: a) retención del antígeno en su sitio original, b) accesibilidad del antígeno y c) conformación/preservación correcta del antígeno/epítipo de interés.

Lo que es muy sorprendente es el hecho de que los anticuerpos según la presente invención también tienen un funcionamiento excelente con muestras de tejido que se han fijado con formalina e incrustado en parafina.

En una realización la presente invención se refiere a un método inmunohistoquímico para la detección de HER3 humano con un anticuerpo según la presente invención en el que la muestra de tejido sobre la que se realiza la inmunotinción es una muestra de tejido que se había fijado con formaldehído e incrustado en parafina (FFPE).

Están disponibles varios fijadores y se usan en la rutina de un laboratorio de patología clínica, como glutaraldehído, formaldehído y acetona, u otros disolventes orgánicos. Sin embargo, la gran mayoría de los procedimientos de fijación se basan en el uso de agentes de reticulación, como formaldehído. La disolución fijadora es habitualmente una disolución acuosa de formaldehído que contiene fosfatos de sodio, destinada a proporcionar tamponamiento (cambio de pH mínimo tras la adición de una pequeña cantidad de ácido o base fuerte) a pH 7,2-7,6 y una disolución aproximadamente isotónica (una cuya presión osmótica es la misma que la de los fluidos extracelulares de mamíferos, a menudo basada en solución salina fisiológica). Los términos formaldehído y formalina se usan de manera intercambiable.

Tal como se mencionó anteriormente, la fijación en formaldehído se usa lo más ampliamente en patología clínica. El principal motivo es lo más probablemente que mediante la fijación con formaldehído el antígeno de interés queda atrapado en los sitios que ocupa en el organismo vivo. Por medio de puentes metileno introducidos tras la fijación

con formaldehído, también la morfología de una muestra de tejido o células se conserva bien. Sin embargo, estos efectos positivos son a expensas de la permeabilidad de la muestra y de la fijación provocando cambios en la accesibilidad y/o conformación de un antígeno/epítipo de interés, daño en ácidos nucleicos e inactivación de la actividad enzimática.

5 Para el almacenamiento a largo plazo, una muestra de tejido o célula fijada habitualmente tiene que deshidratarse e incrustarse en un medio de incrustación apropiado. La incrustación en parafina es habitualmente preferible para o bien incrustar en plástico o bien cortar muestras no incrustadas con un micrótopo de vibración o en un criostato.

10 Esta divulgación proporciona, entre otras cosas, métodos para detectar HER3 humano en muestras biológicas (por ejemplo, células aisladas o tejidos) que se han montado sobre una superficie sólida (por ejemplo, un portaobjetos de microscopio) y tratado (por ejemplo, fijado con fomalina e incrustado en parafina). Una de las ventajas de realizar inmunohistoquímica sobre muestras de tejido o células FFPE es que HER3 en tal muestra mantiene sustancialmente su posición relativa con otros componentes, por ejemplo, su ubicación dentro de la muestra de tejido o células.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “detectar” significa determinar si un agente (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o proteína) o una interacción (por ejemplo, unión entre un anticuerpo y un antígeno, entre una proteína y un ácido nucleico, o entre dos moléculas de ácido nucleico) está presente o ausente, por ejemplo realizando mediciones a partir de una muestra. En algunos ejemplos esto puede incluir además cuantificación. En
20 ejemplos particulares, se detecta una señal de emisión a partir de un marcador. La detección puede ser a granel, de modo que puede observarse un número macroscópico de moléculas. La detección puede incluir también la identificación de señales a partir de moléculas individuales usando microscopía y técnicas tales como reflexión interna total para reducir el ruido de fondo.

25 Por ejemplo, el uso de un anticuerpo específico para una proteína particular (por ejemplo, HER3 humano) permite la detección de la proteína o la interacción proteína-proteína en una muestra, tal como una muestra de tejido o células FFPE.

30 El anticuerpo según la presente invención puede detectarse mediante marcaje directo del propio anticuerpo, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de hapteno tales como biotina, o una enzima tal como peroxidasa del rábano o fosfatasa alcalina. Alternativamente, se usa anticuerpo primario anti-HER3 conjuntamente con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario. Se conocen bien en la técnica protocolos y kits de inmunohistoquímica (IHC) y están disponibles comercialmente.

35 Opcionalmente, pueden marcarse directamente agentes de unión específica con un resto detectable. Los agentes de detección útiles incluyen compuestos fluorescentes (incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánido, o la familia de cianuro de colorantes (tales como Cy-3 o Cy-5) y similares); compuestos bioluminiscentes (tales como luciferasa, proteína
40 fluorescente verde (GFP) o proteína fluorescente amarilla); enzimas que pueden producir un producto de reacción detectable (tales como peroxidasa del rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina o glucosa oxidasa y similares), o radiomarcadores (tales como ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I o ^{131}I).

45 Las muestras biológicas útiles en un método dado a conocer se aíslan, se analizan *in vitro* e incluyen cualquier preparación celular o preparación tisular que pueda fijarse y montarse sobre una superficie sólida. Las muestras a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, frotis de sangre, preparaciones de citocentrífuga, frotis de citología, biopsias centrales, aspirados con aguja fina y/o secciones de tejido (por ejemplo, secciones de tejido de criostato y/o secciones de tejido incrustadas en parafina). Pueden aislarse muestras biológicas a modo de ejemplo de tejidos o células normales, o de células o tejidos neoplásicos. La neoplasia es un estado biológico en el que una o más
50 células han experimentado una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la tasa de crecimiento, invasión del tejido circundante, y células que pueden experimentar metástasis. Pueden aislarse células o tejidos neoplásicos a modo de ejemplo de tumores sólidos, incluyendo carcinomas de mama (por ejemplo, carcinomas lobulares y ductales), sarcomas, carcinomas del pulmón (por ejemplo, carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de células grandes, carcinoma escamoso y adenocarcinoma), mesotelioma del pulmón, adenocarcinoma colorrectal, carcinoma de estómago, adenocarcinoma prostático, carcinoma de ovario (tal como
55 cistoadenocarcinoma seroso y cistoadenocarcinoma mucinoso), tumores de células germinales de ovario, carcinomas testiculares y tumores de células germinales, adenocarcinoma pancreático, adenocarcinoma biliar, carcinoma hepatocelular, carcinoma de vejiga (incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células de transición, adenocarcinoma y carcinoma escamoso), adenocarcinoma de células renales, carcinomas endometriales (incluyendo, por ejemplo, adenocarcinomas y tumores de tumores de Muller mixtos (carcinosarcomas)), carcinomas
60 del endocérvix, ectocérvix y vagina (tales como adenocarcinoma y carcinoma escamoso de cada uno de los mismos), tumores de la piel (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, melanoma y tumores de apéndice cutáneo), carcinoma esofágico, carcinomas de la nasofaringe y orofaringe (incluyendo carcinoma escamoso y adenocarcinomas de la misma), carcinomas de glándulas salivales, tumores del
65 cerebro y sistema nervioso central (incluyendo, por ejemplo, tumores de origen glial, neuronal y meníngeo), tumores de nervio periférico, sarcomas de tejidos blandos y sarcomas de hueso y cartílago.

Un soporte sólido útil en un método dado a conocer sólo necesita aguantar la muestra biológica y, opcionalmente, pero ventajosamente, permitir la detección conveniente de componentes (por ejemplo, proteínas y/o secuencias de ácido nucleico) en la muestra. Los soportes a modo de ejemplo incluyen portaobjetos de microscopio (por ejemplo, portaobjetos de microscopio de vidrio o portaobjetos de microscopio de plástico), cubreobjetos (por ejemplo, cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), placas de cultivo tisular, placas de múltiples pocillos, membranas (por ejemplo, nitrocelulosa o poli(cloruro de vinilideno) (PVDF)) o chips BIACORE™.

La reticulación debida a fijación con formaldehído es probable que enmascare o destruya epítomos, conduciendo a una inmunotinción falsa negativa. Se ha encontrado que un epítomo en HER3 humano tal como se reconoce por un anticuerpo según la presente invención puede recuperarse fácilmente, por ejemplo, mediante los procedimientos convencionales puestos en práctica automáticamente en el analizador BenchMark (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, EE.UU.). En una realización la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo tal como se da a conocer en la presente invención en la detección de HER3 en una muestra de tejido fijado con formaldehído incrustado en parafina (FFPET).

También se contemplan kits útiles para facilitar la práctica de una detección inmunohistoquímica de HER3 humano tal como se da a conocer en el presente documento. En una realización, se proporciona un kit para la detección de HER3 humano en una muestra de tejido fijada con formaldehído incrustada en parafina, comprendiendo dicho kit un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, según la invención, y reactivos para la detección de dicho anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo.

En ejemplos particulares, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, según la invención y los reactivos para la detección de dicho anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo se envasan en recipientes o viales diferenciados.

En algunas realizaciones de kit, el anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo puede marcarse directamente, por ejemplo, con un fluoróforo, cromóforo o enzima que puede producir un producto detectable (tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano y otras comúnmente conocidas en la técnica).

Otras realizaciones de kit incluirán medios de detección secundarios; tales como anticuerpos secundarios (por ejemplo, anticuerpos de cabra anti-conejo, anticuerpos de conejo anti-ratón, anticuerpos anti-hapteno) o moléculas de unión a hapteno distintas de anticuerpo (por ejemplo, avidina o estreptavidina). En algunos de tales casos, los medios de detección secundarios se marcarán directamente con un resto detectable. En otros casos, el anticuerpo secundario (u orden superior) se conjugará con un hapteno (tal como biotina, DNP y/o FITC), que es detectable mediante una molécula de unión a hapteno relacionada marcada detectablemente (por ejemplo, estreptavidina (SA) peroxidasa del rábano, SA fosfatasa alcalina y/o SA QDot® Nanocrystals™). Algunas realizaciones de kit pueden incluir reactivos colorimétricos (por ejemplo, DAB y/o AEC) en recipientes adecuados que van a usarse conjuntamente con medios de detección primarios o secundarios (u orden superior) (por ejemplo, anticuerpos) que se marcan con enzimas para el revelado de tales reactivos colorimétricos.

En algunas realizaciones, un kit incluye muestras de control positivo o negativo, tales como un tejido o línea celular que se sabe que expresa o no expresa HER3 humano. En ejemplos particulares, las muestras de control son muestras FFPET. Las muestras a modo de ejemplo incluyen pero no se limitan a tejidos o células normales (por ejemplo, no cancerosos).

En algunas realizaciones, un kit incluye materiales de instrucciones que dan a conocer, por ejemplo, medios de uso de un anticuerpo que se une específicamente a HER3 humano. Los materiales de instrucciones pueden estar escritos, en una forma electrónica (por ejemplo, disquete de ordenador o disco compacto) o puede ser visual (por ejemplo, archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que el kit está diseñado. Por tanto, por ejemplo, el kit puede incluir tampones y otros reactivos usados rutinariamente para la práctica de una detección inmunohistoquímica tal como se da a conocer en el presente documento. Tales kits y contenido apropiado los conocen bien los expertos en la técnica.

Determinadas realizaciones de kit pueden incluir un medio portador, tales como una caja, una bolsa, un sobre, cartón plástico (tal como plástico moldeado u otro envase transparente), envoltorio (tal como un envoltorio metálico, de papel o plástico sellado o sellable), u otro recipiente. En algunos ejemplos, los componentes del kit quedarán encerrados en una única unidad de envasado, tal como una caja u otro recipiente, unidad de envasado que puede tener compartimentos en los que pueden colocarse uno o más componentes del kit. En otros ejemplos, un kit incluye uno o más recipientes, por ejemplo viales, tubos, y similares que pueden retener, por ejemplo, una o más muestras biológicas que van a someterse a prueba.

Otras realizaciones de kit incluyen, por ejemplo, jeringas, hisopos de algodón o guantes de látex, que pueden ser útiles para manipular, recoger y/o procesar una muestra biológica. Los kits también pueden contener opcionalmente instrumentos útiles para mover una muestra biológica de una ubicación a otra, incluyendo, por ejemplo, goteros, jeringas, y similares. Todavía otras realizaciones de kit pueden incluir medios de eliminación para desechar artículos

usados o que ya no se necesitan (tales como muestras del sujeto, etc.). Tales medios de eliminación pueden incluir, sin limitación, recipientes que pueden contener fugas de materiales desechados, tales como recipientes, cajas o bolsas de plástico, metal u otros impermeables.

- 5 Los términos “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico”, tal como se usan en el presente documento, pretenden incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. Un ácido nucleico está “operativamente unido” cuando está
10 colocado en una relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si
afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “operativamente unido” significa que las
secuencias de ADN que están uniéndose son colineales y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante ligamiento en sitios
15 de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan ligadores o adaptadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

Una realización de la invención es un ácido nucleico que codifica para una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo según la invención.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan de manera intercambiable y todas de tales designaciones incluyen la progenie. Por tanto, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en
25 contenido en ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye progenie variante que tiene la misma función o actividad biológica tal como se examina en la célula transformada originalmente.

- El término “vector”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un
30 bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden dar una replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por
ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la
35 introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de manera
40 intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, virus adenoasociados, adenovirus y retrovirus de replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

- El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), tal como se usa en el presente
45 documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular sino a la progenie de una célula de este tipo. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a o bien mutación o bien influencias medioambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero se incluye todavía dentro del alcance del término “célula huésped” tal como se usa en el
50 presente documento.

- Los anticuerpos según la invención se producen preferiblemente por medios recombinantes. Tales métodos se conocen ampliamente en el estado de la técnica y comprenden expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con aislamiento posterior del polipéptido de anticuerpo y habitualmente purificación hasta una pureza
55 aceptable. Para la expresión de proteínas, se insertan ácidos nucleicos que codifican para cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión por métodos convencionales. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas, tales como células CHO, células NSO, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (a partir del sobrenadante o tras la lisis celular). Se conoce bien en la técnica la producción recombinante de anticuerpos y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., *et al.*, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880. Los anticuerpos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se realiza con el fin de eliminar otros
60 componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo, cromatografía en columna y otras bien conocidas en la técnica (véase Ausubel, F., *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987)).

La expresión en células NSO la describen, por ejemplo, Barnes, L.M., *et al*, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., *et al*, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria la describe, por ejemplo, Durocher, Y., *et al*, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables la describe Orlandi, R., *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., *et al*, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferido (HEK 293) lo describen Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83, y Schlaeger, E.-J., en J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199. Se separan adecuadamente anticuerpos monoclonales del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Se aísla y se secuencia fácilmente ADN y ARN que codifican para los anticuerpos monoclonales usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de tal ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que entonces se transfectan dentro de células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de lo contrario no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped. Anticuerpos que pueden obtenerse a partir de dichas líneas celulares son realizaciones preferidas de la invención. Se preparan preferiblemente anticuerpos afocusilados por medio en glicoingeniería tal como se describió anteriormente.

Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpo anti-HER3 introduciendo cambios de nucleótidos apropiados dentro del ADN que codifica para anticuerpos, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones pueden realizarse, sin embargo, sólo en un intervalo muy limitado, por ejemplo, tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características de anticuerpo mencionadas anteriormente tales como el isotipo de IgG y la unión a epítopos, pero puede mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de proteínas o facilitar la purificación. Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-HER3 también puede sustituirse, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y para prevenir la reticulación aberrante. A la inversa, puede(n) añadirse enlace(s) cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv). Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Por "alterar" quiere decirse eliminar uno o más restos hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos está normalmente unida a N. Unida a N se refiere a la unión del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La adición de sitios de glicosilación para el anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unida a N).

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican para variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpo anti-HER3 mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen de manera natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada más temprano o una versión no variante de anticuerpo anti-HER3 humanizado.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes estadounidenses n.ºs 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192; 4.179.337.

Los dominios variables de cadena pesada y ligera según la invención se combinan con secuencias de promotor, iniciación de la traducción, región constante, región no traducida en 3', poliadenilación y terminación de la transcripción para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado dentro de células huésped que entonces se fusionan formando una única célula huésped que expresa ambas cadenas.

La siguiente lista de secuencias, ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención, el alcance verdadero de la cual se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden hacerse modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del alcance de la invención.

Descripción de la lista de secuencias

Secuencia	Anticuerpo monoclonal frente a HER3, clon MAK<HER3 humano>
SEQ ID NO: 1 Secuencia de CDR1H: TFTDYNLH	M-7.2.42 M-7.3.8
SEQ ID NO: 2 Secuencia de CDR2H, variante 1: YFNPYNGGTFYTQK	M-7.2.42
SEQ ID NO: 3 Secuencia de CDR2H, variante 2: YFNTYNGGIFYTQK	M-7.3.8
SEQ ID NO: 4 Secuencia de CDR3H: TRRYFDGSSYF	M-7.2.42 M-7.3.8
SEQ ID NO: 5 Secuencia de CDR1L: RSSQTIVH	M-7.2.42
SEQ ID NO: 6 Secuencia de CDR2L, variante 1: QSLKL	M-7.2.42
SEQ ID NO: 7 Secuencia de CDR2L, variante 2: QSPKL	M-7.3.8
SEQ ID NO: 8 Secuencia de CDR3L: FQGSHVPRA	M-7.2.42
SEQ ID NO: 9 Secuencia de VH, variante 1: EVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT DYNLHWVKQSHGRTLEWIGYFNPYNGGTF YTQKFKDKATLTINKSSSTAYMELRSLTSED SAVYYCTRRYFDGSSYFDYWGGTTLTVSS	M-7.2.42
SEQ ID NO: 10 Secuencia de VH, variante 2: EVQLQSGPELAKPGASVKMSCKASGYTFT DYNLHWVKQSHGKLEWIGYFNTYNGGIF YTQKFKDKATLTINKSSSTAYMELRSLTSED SAVYYCTRRYFDGSSYFDYWGRGTTLTVSS	M-7.3.8
SEQ ID NO: 11 Secuencia de VL, variante 1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHS NGNTYLEWYVQKPGQSLKLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHVPRAFGGGTKLEIKR	M-7.2.42
SEQ ID NO: 12 Secuencia de VL, variante 2: DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHS NGNTYLEWYVQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC FQGSHPRTFGGGTKLEIKR	M-7.3.8

Descripción de las figuras

Figura 1

5

Ensayos de inmunotransferencia de tipo Western comparativos con varias líneas celulares de control transfectadas

10

Se separaron lisados celulares preparados a partir de líneas celulares HEK293 que sobreexpresan HER1, HER2, HER3, HER4 o transfectadas con el vector de expresión de mamíferos pRK5 (como control negativo) mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Tras bloquear, se incubó la membrana con anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.2.42 o con anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.3.8 o el anticuerpo monoclonal del estado de la técnica anti-HER3 DAK-H3-IC de Dako a TA o 37°C. Se usó Fab anti-ratón conjugado con HRP como anticuerpo secundario.

Figura 2Ensayos de inmunotransferencia de tipo Western comparativos con muestras de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

Se separaron lisados celulares preparados a partir de muestras de NSCLC recién congeladas mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Tras bloquear, se incubó la membrana con anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.2.42 o el anticuerpo monoclonal del estado de la técnica anti-HER3 DAK-H3-IC de Dako a 37°C. Se usó Fab anti-ratón conjugado con HRP como anticuerpo secundario.

Figura 3Inmunohistoquímica sobre muestras de control de línea celular usando los anticuerpos monoclonales MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8

Se analizaron células HEK293 fijadas en formalina incrustadas en parafina que sobreexpresaban HER1, HER2, HER3 o HER4 en el instrumento Benchmark XT de tinción de portaobjetos automatizados de Ventana, usando el reactivo de acondicionamiento celular 1 (CC1) convencional para la preparación de muestras, anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.2.42 o anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.3.8 como anticuerpo primario y ultra Vista DAB como sistema de detección.

Figura 4Ensayos de inmunohistoquímica comparativos sobre muestras de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) FFPET

Comparación de las propiedades de tinción y los patrones de tinción del anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.2.42 frente al anticuerpos del estado de la técnica anti-HER3 DAK-H3-IC de Dako sobre tejido de NSCLC fijado con formalina incrustado en parafina rutinariamente.

A y B: Inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.2.42 en el sistema Benchmark XT de Ventana usando el reactivo de acondicionamiento celular (CC1) convencional para la preparación de muestras y ultra Vista DAB como sistema de detección.

C: Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-HER3 DAK-H3-IC de Dako en la plataforma Dako Autostainer semiautomatizada usando el sistema de detección Ultra Vision LP y DAB. El procedimiento de desparafinización y las etapas de recuperación de antígeno se llevaron a cabo manualmente. El anticuerpo DAK-H3-IC de Dako no puede usarse en el sistema Benchmark XT de Ventana ya que no muestra ninguna actividad de unión en muestras de FFPET en esta plataforma.

Figura 5Ensayos de inmunohistoquímica comparativos sobre muestras de tejidos tumorales humanos de cáncer de colon y pulmón

Comparación de las propiedades de tinción y patrones de tinción del anticuerpo monoclonal frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.3.8 (izquierda; 0,125 µg/ml) frente a los anticuerpos del estado de la técnica anti-HER3 C17 de Santa Cruz (derecha; 0,125 µg/ml) en muestras de tejidos fijadas con formalina incrustadas en parafina rutinariamente. En cada una de las figuras 5A a D, las ilustraciones derecha e izquierda muestran la unión de MAK<HER3 humano> M-7.3.8 y C17, respectivamente (amplificación: 10X (parte superior) y 20X (parte inferior)).

A: Muestra de tejido tumoral humano, colon A1278-Tp6

B: Muestra de tejido tumoral humano, colon B594-Tp5

C: Muestra de tejido tumoral humano, colon CRC 071147.1.1

D: Muestra de tejido tumoral humano, pulmón p339-Tc16

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales frente a HER3.

Para la generación de un anticuerpo monoclonal, se inmunizaron ratones Balb/c hembra de ocho semanas de edad por vía intraperitoneal con 100 µg de un péptido de antígeno de HER3 emulsionado en cFA. El antígeno se sintetizó previamente empleando un sintetizador de péptidos automatizado, equipado con un espaciador adecuado y

acoplado de manera N-terminal a KLH (hemocianina de lapa californiana). A la inmunización inicial le siguieron tres inmunizaciones adicionales con iFA tras 6 semanas a intervalos mensuales. Tres días antes de la extirpación del bazo, se reforzaron los ratones por vía intravenosa con 50 µg del antígeno. Se fusionaron células de bazo y células de mieloma P3X63Ag8.653 con PEG y se cultivaron en medio de selección HAZ. Tras la eliminación, se prepararon preparaciones de células individuales del bazo y se fusionaron células del bazo con células de mieloma tal como se describió por ejemplo en Kohler y Milstein (1975). Se examinaron los hibridomas resultantes con ELISA para determinar su reactividad contra un péptido de examen biotinilado con una secuencia correspondiente al inmunógeno usado. Se recubrieron MTP de 384-pocillos recubiertos con estreptavidina con péptido de HER3 biotinilado y se incubaron con sobrenadantes de hibridoma sin diluir. Entonces se estudiaron con sonda las placas con anticuerpo de oveja específico anti-IgG-Fc murino marcado con HRP y se revelaron con ABTS. Se sometió a prueba la afinidad de unión de los hibridomas seleccionados mediante análisis de Biacore. Se clonaron hibridomas con alta afinidad por su respectiva secuencia de inmunógeno mediante deposición de células individuales usando un instrumento FACS Aria III. Los subclones monoclonales resultantes se sometieron a prueba de nuevo mediante análisis de ELISA y Biacore.

Ejemplo 2

Pruebas de sobrenadantes de cultivo de hibridomas mediante análisis de Biacore.

Para la selección de anticuerpos adecuados, se realizó un examen cinético en sobrenadantes de cultivo de hibridomas. Se realizaron las mediciones usando la tecnología Biacore SPR. Se montó el chip sensor CM5 serie S en un instrumento A100 (GE Healthcare, Biacore) y se abordó hidrodinámicamente en tampón HBSN (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) según las instrucciones del fabricante. El tampón del sistema era HBS-ET (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, TWEEN 20 al 0,05%). El tampón de muestra era el tampón del sistema complementado con CMD 1 mg/ml (carboximetildextrano, Sigma n.º 86524). Se dirigió el sistema a 25°C.

Se inmovilizaron 10000 UR de RAMIgGFC (unidades relativas de fragmento de conejo anti-F(c)gamma ratón de la subclase G de inmunoglobulina de ratón respectiva / Jackson Laboratories) según las instrucciones del fabricante usando química de EDC/NHS sobre las células de flujo FC1 (anti-F(c)gamma de ratón de subclase 1), FC2, FC3 y FC4, respectivamente, sobre los puntos sensibles 1, 2, 4 y 5 en cada célula de flujo. Se desactivaron los puntos usando etanolamina 1 M.

Se sometió a prueba cinéticamente la actividad de unión de los anticuerpos contra el péptido de HER3. Se capturaron anticuerpos mediante una inyección de 1 min a 10 µl/min de sobrenadantes de hibridoma en bruto diluidos 1:3 en tampón de muestra. Se inyectaron individualmente de manera cuidadosa péptidos de Her-3 biotinilados sobre estreptavidina para ampliar el peso molecular de los complejos y para aumentar la sensibilidad de masa del sistema. Puesto que la disociación del complejo de antígeno k_d es independiente de la concentración de inyección de analito, este es un método legal para aumentar la sensibilidad del sistema.

Se inyectó el péptido-injerto respectivo durante 5 min a 30 µl/min y se monitorizó la disociación durante 3 min. Regeneración ácida de la superficie del sensor usando 3 inyecciones consecutivas de glicina 10 mM pH 1,5 a 30 µl/min.

Se evaluaron los datos usando el software Biaevaluation A100 V.1.1 según las instrucciones del fabricante. Se calcularon la unión tardía (UR), estabilidad tardía (UR), R_{Max} , k_d (1/s) y MR (razón molar). Se puntuaron los clones según su estabilidad de complejo de antígeno y MR.

Se evaluaron los datos usando el software Biaevaluation V.4.1 según las instrucciones del fabricante. Se calcularon las constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) y se calculó $t_{1/2}$ dis. $t_{1/2}$ dis. = $\ln(2)/60 \cdot k_d$ [min]. Los datos respectivos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: - Parámetros cinéticos de clones de anticuerpos anti-HER3 monoclonales

Anticuerpo monoclonal	Isotipo	k_d [1/s]	$t_{1/2}$ dis. [min]
MAK<HER3 humano>M-1.1.1	IgG1k	4,26E-04	27
MAK<HER3 humano>M-1.2.2	IgG1k	4,18E-04	28
MAK<HER3 humano>M-1.1.4	IgG2ak	2,92E-04	40
MAK<HER3 humano> M-6.3.1	IgG1k	9,28E-04	12
MAK<HER3 humano> M-7.3.8	IgG2ak	2,66E-05	435
MAK<HER3 humano> M-7.2.42	IgG2ak	4,26E-05	271

Los anticuerpos monoclonales MAK<HER3 humano> M-7.3.8 y MAK<HER3 humano> M-7.2.42 muestran un $t_{1/2}$

dis. de estabilidad del complejo suficiente para su aplicación en la plataforma Benchmark XT de Ventana.

Especialmente la disociación bastante lenta es de importancia clínica para la tinción con IHC usando la plataforma Benchmark XT de Ventana.

Tal como resulta obvio a partir de la tabla 2, se observa una disociación muy lenta con los anticuerpos monoclonales producidos por los (clones) de hibridoma MAK<HER3 humano> M-7.3.8 y MAK<HER3 humano> M-7.2.42, mostrando MAK<HER3 humano> M-7.3.8 la disociación más lenta.

Ejemplo 3

Inmunotransferencia de tipo Western.

Se realizó análisis de inmunotransferencia de tipo Western comparativo usando los anticuerpos monoclonales frente a HER3 recién generados MAK<HER3 humano> M-7.2.42, MAK<HER3 humano> M-7.3.8 y el anticuerpo monoclonal DAK-H3-IC de Dako.

a) Ensayos de inmunotransferencia de tipo Western comparativos con varias líneas celulares de control transfectadas

Se prepararon lisados a partir de varias líneas celulares de control HEK293. Se transfectaron las células transitoriamente con plásmidos que codifican para HER1, HER2, HER3 o HER4. Se usaron células HEK293 transfectadas con el vector de expresión de mamíferos pRK5 como control negativo. Para la inmunotransferencia de tipo Western, se cargaron 10 µg de lisados de proteína por carril sobre geles de SDS NuPage al 4-12% (Invitrogen). Se realizó la inmunotransferencia de tipo Western según protocolos convencionales con tampones y reactivos de NuPage convencionales (Invitrogen). Tras bloquear, se incubó la membrana con MAK<HER3 humano> M-7.2.42, MAK<HER3 humano> M-7.3.8 o el anticuerpo monoclonal frente a HER3 DAK-H3-IC de Dako. Se usaron MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8 a una concentración de 1 ng/ml. Se realizó la incubación con anticuerpo primario durante 60 min a TA y a 37°C. Se usó Fab anti-ratón conjugado con HRP como anticuerpo secundario. La dilución del anticuerpo DAK-H3-IC se realizó tal como recomendó su fabricante y la elección del anticuerpo secundario (detección) se adaptó según se requería. Se reveló la membrana con ECL (Amersham) y se expuso a una película de rayos X.

Se facilitan resultados de las inmunotransferencias individuales en la figura 1. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western comparativo indica que el MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8 recién desarrollados detectan específicamente HER3 y no muestran reacciones cruzadas con HER1, HER2, HER4 u otras proteínas. Estas características de unión pueden encontrarse a TA y 37°C, mientras que el anticuerpo monoclonal frente a HER3 DAK-H3-IC de Dako muestra una actividad de unión más débil significativa a 37°C. Como tales, los MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8 recién desarrollados muestran características de unión superiores en ensayos de inmunotransferencia de tipo Western en comparación con el anticuerpo monoclonal del estado de la técnica anti-HER3 DAK-H3-IC de Dako, particularmente en condiciones de temperatura usadas en sistemas de tinción automatizados.

b) Ensayos de inmunotransferencia de tipo Western comparativos con muestras de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)

Se lisaron muestras de NSCLC recién congeladas muestras con diferentes niveles de expresión de HER3 desde 0 hasta más de y se analizaron con MAK<HER3 humano> M-7.2.42 o el anticuerpo DAK-H3-IC de Dako a 37°C de manera análoga al procedimiento de SDS-PAGE/inmunotransferencia de tipo Western descrito en el ejemplo 3a).

En la figura 2 se facilitan resultados de las inmunotransferencias individuales. El análisis de inmunotransferencia de tipo Western comparativo indica que el MAK<HER3 humano> M-7.2.42 recién desarrollado muestra una sensibilidad de unión significativamente mayor hacia HER3 en comparación con el anticuerpo monoclonal del estado de la técnica anti-HER3 DAK-H3-IC de Dako.

Ejemplo 4

Secuenciación.

Para obtener las secuencias de ADN de los clones de hibridoma seleccionados, se realizó una PCR RACE en 5'. Para la RT-PCR, se preparó ARN total a partir de 5×10^6 células usando un kit de purificación de ARN total (Qiagen). La transcripción inversa y la PCR se realizaron usando un kit de PCR RACE de cebador en 5' (Roche). Se purificaron los fragmentos de PCR resultantes de cadena pesada y ligera mediante electroforesis en gel con extracción del gel posterior. Se clonaron los fragmentos de PCR usando el kit de clonación Topo Zero-Blunt (Invitrogen) y se transformaron dentro de células químicamente competentes. Se enviaron varios clones de cada hibridoma para su secuenciación para obtener secuencias de consenso para los clones seleccionados.

Ejemplo 5

Inmunohistoquímica.

- 5 a) Inmunohistoquímica sobre muestras de control de línea celular usando el anticuerpo monoclonal MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8

10 Se mostró la idoneidad de los anticuerpos monoclonales frente a HER3 recién desarrollados MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8 usando controles de línea celular FFPE. Por tanto, se fijaron células HEK293 transfectadas o no transfectadas con HER1, HER2, HER3 o HER4, respectivamente, con formaldehído tamponado con PBS al 4% y se incrustaron posteriormente en parafina.

15 Todos los procedimientos de tinción se realizaron en el dispositivo de tinción IHC automatizado Benchmark XT de Ventana usando tampones y reactivos de Ventana, es decir, entre otros, el reactivo de acondicionamiento celular (CC1) convencional para la preparación de muestras y ultraView DAB como sistema de detección.

20 Tal como resulta obvio a partir de la figura 3, los anticuerpos monoclonales frente a HER3 recién desarrollados MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8 muestran tinción de membrana específica sólo en células transfectadas con HER3. Las células transfectadas con HER1, HER2 y HER4 y células de control son negativas. Los anticuerpos monoclonales frente a HER3 MAK<HER3 humano> M-7.2.42 y MAK<HER3 humano> M-7.3.8 muestran buena tinción con IHC con células transfectadas con HER3 si se usan según protocolos convencionales en el analizador Benchmark XT de Ventana (véase la figura 3, tinción celular con leyenda HER3).

- 25 b) Ensayos de inmunohistoquímica comparativos en muestras de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) FFPET

30 Se evaluó adicionalmente el anticuerpo monoclonal MAK<HER3 humano> M-7.2.42 para determinar su idoneidad de tinción inmunohistoquímica a partir de muestras de tejido fijado con formalina incrustado en parafina (FFPET) en comparación con el anticuerpo monoclonal del estado de la técnica DAK-H3-IC de Dako. Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron en muestras de tejidos de NSCLC fijadas con formalina incrustadas en parafina rutinariamente. La tinción con MAK<HER3 humano> M-7.2.42 se realizó en la plataforma Benchmark XT de Ventana usando reactivos y procedimientos convencionales, es decir, entre otros, el reactivo de acondicionamiento celular (CC1) convencional para la preparación de muestras y ultraView DAB como sistema de detección. El ensayo de

35 inmunohistoquímica con el anticuerpo DAK-H3-IC de Dako contra HER3 se realizó en la plataforma semiautomatizada Autostainer de Dako usando el sistema de detección UltraVision LP y DAB. El procedimiento de desparafinización y las etapas de recuperación de antígeno se llevaron a cabo manualmente. El anticuerpo DAK-H3-IC de Dako no puede usarse en el sistema Benchmark XT de Ventana ya que no muestra ninguna actividad de unión en muestras de FFPET en esta plataforma.

40 Tal como resulta obvio a partir de la figura 4A, que es una sección ampliada de la muestra de tejido mostrada en la figura 4B, el anticuerpo monoclonal recién desarrollado MAK<HER3 humano> M-7.2.42 muestra una fuerte tinción de la membrana en células tumorales. La intensidad de tinción es significativamente más fuerte que la intensidad de tinción obtenida con anticuerpos DAK-H3-IC de Dako del estado de la técnica contra HER3. Como tal, el anticuerpo

45 monoclonal MAK<HER3 humano> M-7.2.42 muestra alta especificidad de unión y sensibilidad hacia HER3 en muestras de FFPET y proporciona una detección fiable de la expresión de HER3 cuando se usa en sistemas automatizados para la tinción de muestras clínicas de tumores humanos.

- 50 c) Ensayos de inmunohistoquímica comparativos en muestras de tejido tumoral humano de cáncer de colon y pulmón

55 Para analizar la sensibilidad de los nuevos anticuerpos anti-HER3 para inmunohistoquímica en comparación con anticuerpos comercialmente disponibles, se realizaron tinciones de secciones consecutivas. Se prepararon secciones consecutivas de 3 µm a partir de tejidos tumorales humanos fijados con formalina incrustados en parafina de cáncer de colon y pulmón. Se realizaron todas las tinciones en el instrumento Benchmark XT de Roche/Ventana. Para la recuperación de antígeno, se aplicó el tampón CC1 durante 60 min, seguido por tinción con los diferentes anticuerpos primarios (MAK<HER3 humano> M-7.3.8 y Santa Cruz C17). Se realizó la detección de anticuerpos primarios usando el kit OptiView de Ventana. Se usaron ambos anticuerpos a una concentración de 125 ng/ml.

60 Tal como se muestra en las figuras 5A a D, el anticuerpo MAK<HER3 humano> M-7.3.8 puede detectar claramente la expresión y la localización en la membrana de Her3 dentro de tejidos tumorales, incluso cuando se expresa Her3 en bajas cantidades. En comparación con el nuevo anticuerpo 7.3.8, la tinción de los mismos casos de tumor con el anticuerpo comercial C17 no era detectable.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une a HER3 humano, caracterizado porque:

5 - el dominio variable de cadena pesada comprende:

una región CDR1H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,

10 una región CDR2H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y

una región CDR3H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y

15 - el dominio variable de cadena ligera comprende:

una región CDR1L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5,

20 una región CDR2L que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, y

una región CDR3L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

25 en el que SEQ ID NO: 2 está combinada con SEQ ID NO: 6 y en el que SEQ ID NO: 3 está combinada con SEQ ID NO: 7.

2. Anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, caracterizado porque:

30 el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; o

el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

35 3. Anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

4. Método para realizar inmunohistoquímica, comprendiendo el método las etapas de:

40 a) incubar una muestra de tejido con un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, mediante lo cual tiene lugar la unión de dicho anticuerpo a HER3 en dicho tejido, y

b) teñir dicha muestra de tejido para el anticuerpo anti-HER3 unido en la etapa (a).

45 5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha muestra de tejido es una muestra de tejido que se ha fijado con formaldehído e incrustado en parafina (FFPE).

6. Método según la reivindicación 4 ó 5, en el que las etapas a) y b) se realizan usando un instrumento automatizado.

50 7. Kit para la detección de HER3 humano en una muestra de tejido fijado con formaldehído incrustado en parafina (FFPET), comprendiendo dicho kit:

un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

55 reactivos para la detección de dicho anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo.

8. Ácido nucleico que codifica para una cadena pesada y ligera de un anticuerpo que se une a HER3 humano, caracterizado porque el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

60 9. Vector de expresión caracterizado porque comprende un ácido nucleico según la reivindicación 8 para la expresión del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una célula huésped procariota o eucariota.

65 10. Célula huésped procariota o eucariota que comprende un vector de expresión según la reivindicación 9.

11. Método para la producción de un anticuerpo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por expresar un ácido nucleico según la reivindicación 8 en una célula huésped procariota o eucariota y recuperar dicho anticuerpo de dicha células o el sobrenadante de cultivo celular.

Figura 1

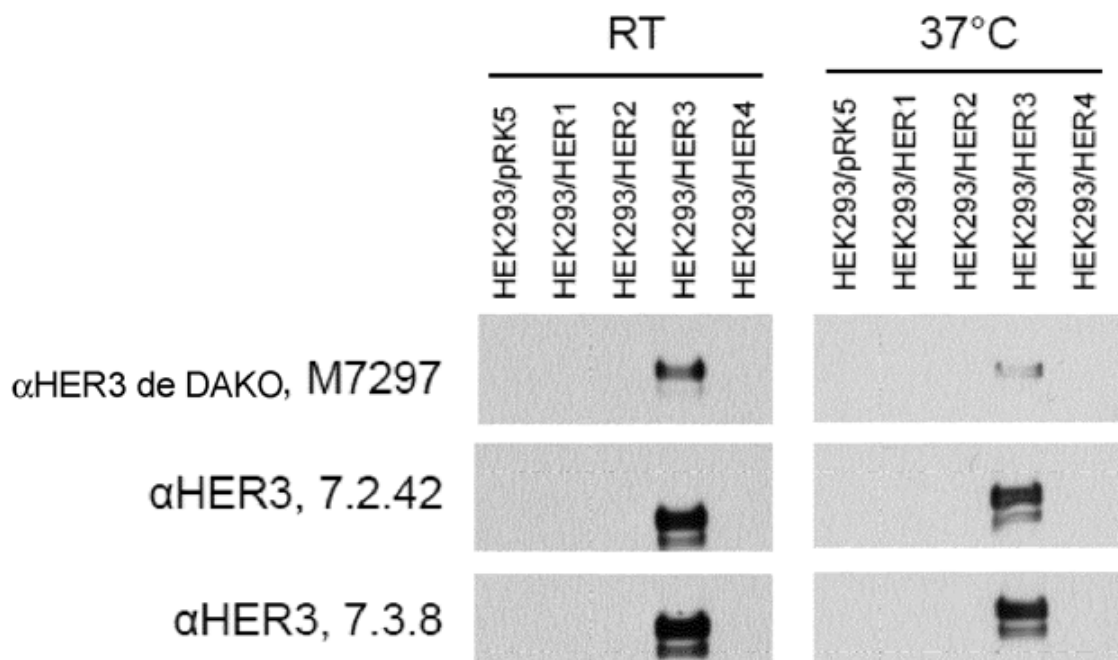


Figura 2

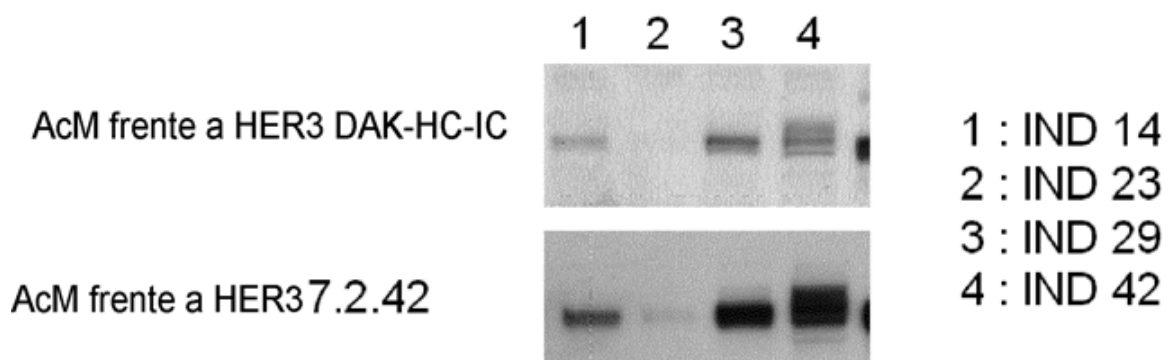


Figura 3

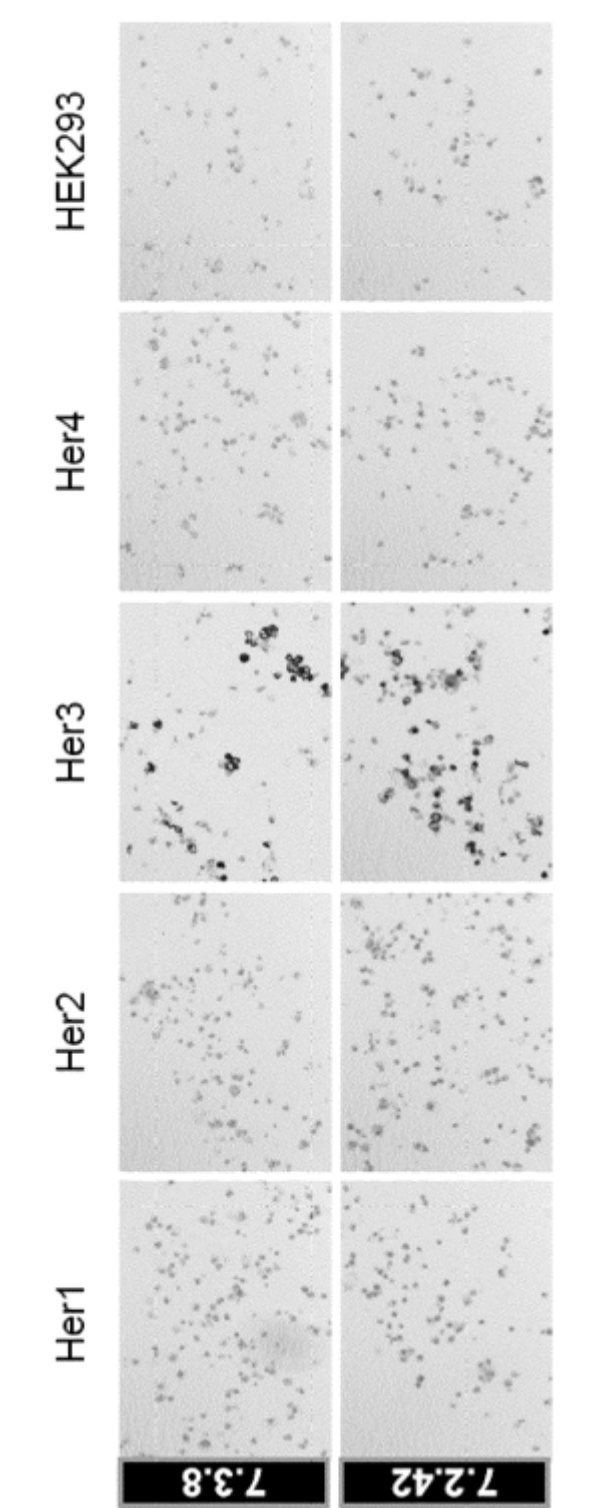


Figura 4

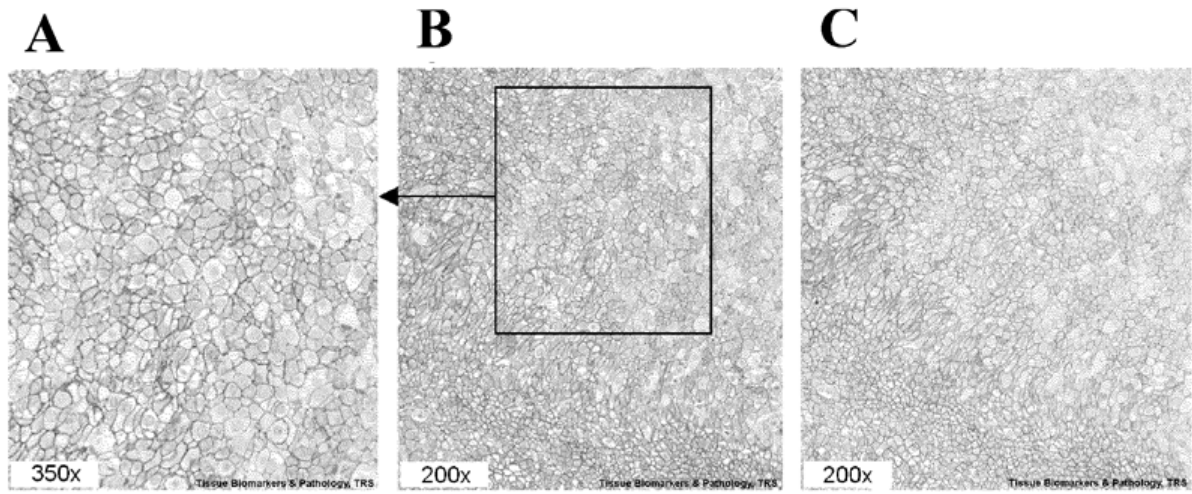


Figura 5A

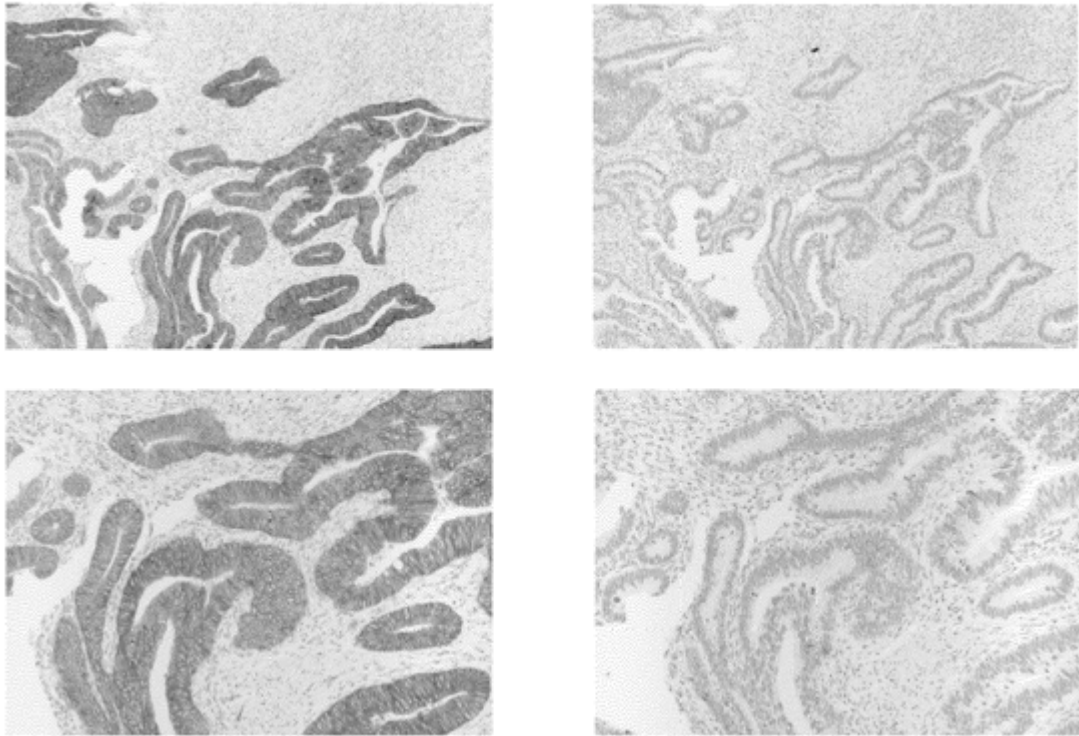


Figura 5B

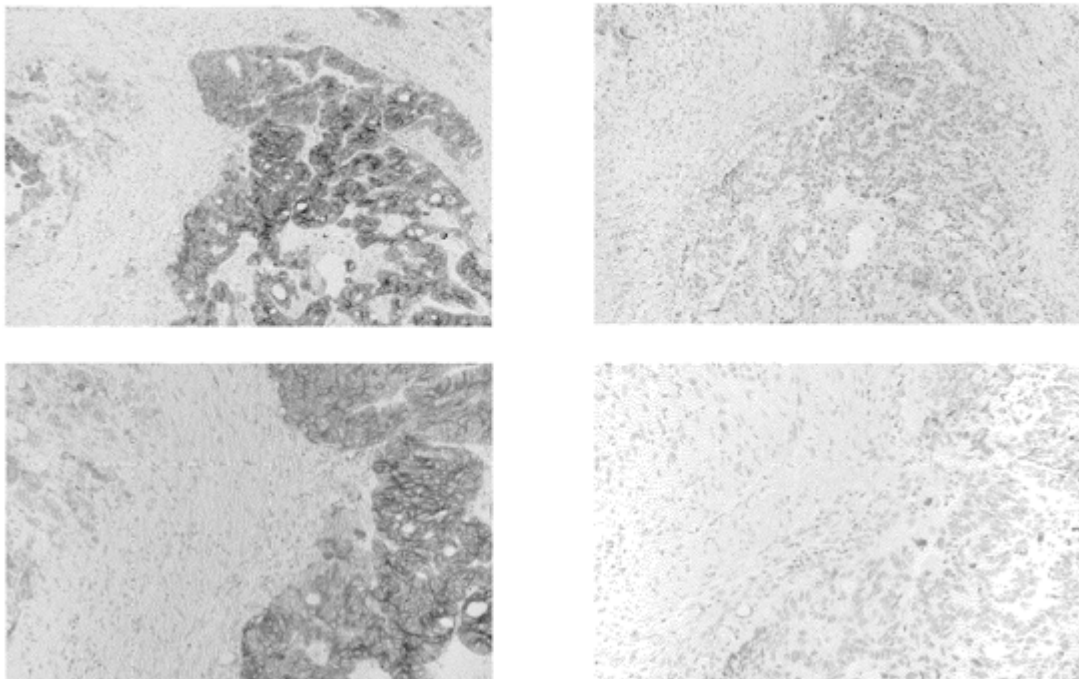


Figura C

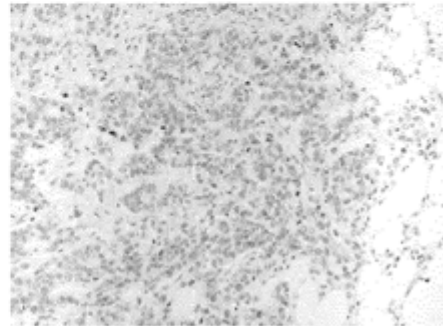
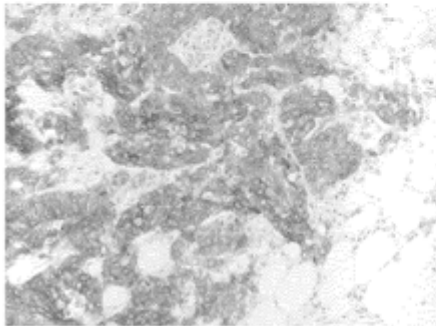
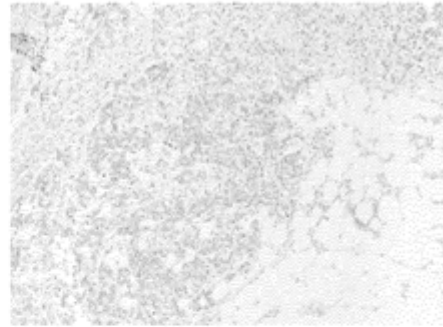
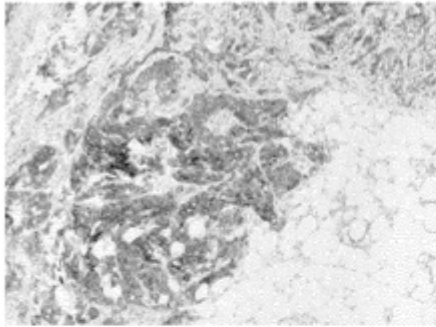


Figura D

