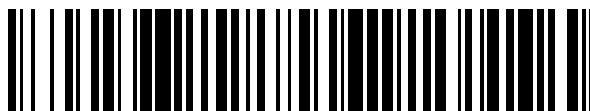


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 558**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2014 PCT/US2014/051789**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031119**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2014 E 14839306 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 3038645**

54 Título: **Método de prevención y/o tratamiento de cánceres ErbB2-positivos**

30 Prioridad:

26.08.2013 US 201361870054 P

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

06.05.2019

73 Titular/es:

**HEALTH RESEARCH, INC. (100.0%)
Elm and Carlton Streets
Buffalo, NY 14263, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, YUESHENG;
YANG, LU y
LI, YUN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 711 558 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de prevención y/o tratamiento de cánceres ErbB2-positivos

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS.

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud U.S. N.º 61/870.054 presentada el 26 agosto de 2013.

DECLARACIÓN RELACIONADA CON LA INVESTIGACIÓN PATROCINADA POR EL GOBIERNO FEDERAL

10

La presente invención fue realizada con respaldo gubernamental bajo los contratos N.º R01CA120533, R01CA124627 y R01CA164574 otorgados por el National Cancer Institute. El Gobierno tiene determinados derechos sobre la invención.

15 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente invención se refiere en general al campo de la salud humana, y en particular a métodos para la prevención y el tratamiento de cánceres y/o de otras afecciones que están correlacionadas positivamente con la expresión de ErbB2.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El ErbB2, también conocido como homólogo 2 del oncogén viral de la leucemia eritoblástica aviar v-erb-b2 aviar, Her2, Neu, CD340, protooncogén C-ErbB2, es un miembro de la familia ampliamente investigada de las tirosina quinasa receptoras unidas a membrana plasmática que también incluye ErbB1, ErbB3 y ErbB4 (también conocidos como EGFR/Her1, Her3 y Her4, respectivamente). Se ha demostrado que estos receptores desempeñan papeles críticos en el desarrollo embrionario, la fisiología normal y en el desarrollo de varias enfermedades. Los cuatro receptores ErbB contienen un dominio extracelular (ECD, extracellular domain), un dominio transmembrana y un dominio intracelular que interactúa con las moléculas de señalización. La unión del ligando a los ECD de estos receptores conduce a una homo- o heterodimerización, seguida de la activación de la proteína tirosina quinasa intrínseca y la autofosforilación de tirosina en el dominio intracelular, y el reclutamiento y la activación de proteínas de señalización en estos sitios. En particular, el ErbB3 presenta un deterioro de quinasa y requiere una heterodimerización para su activación. Hasta la fecha, aunque se han identificado múltiples ligandos para ErbB1, ErbB3 y ErbB4, no se ha encontrado ningún ligando para ErbB2 desde su descubrimiento hace casi 30 años (Coussens et al. *Science* 1985; 230: 1132-1139; Schechter et al., *Science* 1985; 229: 976-978). Sin embargo, el ErbB2 es un compañero de dimerización preferido para otros ErbB unidos a ligandos.

El ErbB2 es mejor conocido por su participación en el cáncer de mama humano. La amplificación del gen ErbB2 ocurre en el 20-30% de los cánceres de mama y está significativamente correlacionada con la expresión de la proteína ErbB2 en los tejidos cancerosos. La amplificación del gen ErbB2 o la sobreexpresión de proteínas es un fuerte predictor del mal pronóstico de la enfermedad. Las terapias dirigidas a ErbB2, particularmente el anticuerpo monoclonal humanizado trastuzumab, en combinación con la quimioterapia, muestran una considerable eficacia clínica. Sin embargo, muchos cánceres ErbB2-positivos muestran una resistencia *de novo* o una resistencia adquirida a dicha terapia. Por lo tanto, existe una necesidad continua e insatisfecha de identificar un ligando de ErbB2 y de desarrollar enfoques terapéuticos basados, al menos en parte, en un ligando tal. La presente divulgación satisface esas necesidades.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

50 La presente divulgación proporciona composiciones y métodos útiles para la prevención y/o la terapia de cánceres ErbB2-positivos. Las composiciones y los métodos se refieren al presente descubrimiento de que la prolidasa es un ligando del receptor de ErbB2. Además, se cree que esta divulgación es la primera descripción de cualquier ligando de ErbB2.

55 La prolidasa, también conocida como peptidasa D (PEPD), dipeptidasa Xaa-Pro o prolina dipeptidasa o imidodipeptidasa, es una proteasa que hidroliza los dipéptidos con prolina o hidroxiprolina en el terminal carboxi. La PEPD es una proteína citosólica expresada de forma ubicua y existe como un homodímero (peso molecular monomérico de la PEPD humana: 54 kD; 493 aminoácidos, como se muestra en la SEQ ID NO: 1, que proporciona la secuencia de aminoácidos de la prolidasa humana). En realizaciones, la PEPD que se usa para las composiciones y métodos de la presente divulgación es una PEPD de mamífero. En una realización, la PEPD es PEPD humana. En

realizaciones, la PEPD puede ser enzimáticamente activa o tener una actividad enzimática reducida o no detectable.

Las composiciones comprenden preparaciones farmacéuticas que contienen una PEPD aislada y/o purificada o PEPD recombinante y/o modificada, y pueden comprender además agentes adicionales, tales como un inhibidor de la coagulación. En realizaciones, la PEPD está modificada. En realizaciones, la PEPD es un componente de una proteína de fusión. En realizaciones, la proteína de fusión comprende la PEPD y una secuencia de aminoácidos útil para la purificación de PEPD producida de forma recombinante.

Aunque no es el objeto de la invención reivindicada, los métodos comprenden administrar a un individuo que necesita prevención y/o terapia de un cáncer ErbB2-positivo una composición que comprende una PEPD de esta divulgación, y pueden comprender además administrar al individuo un inhibidor de la coagulación. También se describen métodos para identificar individuos que necesiten un tratamiento con formulaciones de PEPD y métodos para generar un protocolo de tratamiento para dichos individuos.

La divulgación proporciona, además, productos que comprenden preparaciones farmacéuticas que contienen una PEPD aislada y/o purificada o una PEPD recombinante, y que también pueden contener material impreso que describe el uso de las preparaciones para la prevención y/o la terapia de los cánceres ErbB2-positivos. En realizaciones, los productos también contienen un inhibidor de la coagulación. En realizaciones no limitantes, los cánceres ErbB2-positivos son cánceres de mama, de ovario, de estómago o formas agresivas de cáncer uterino, como el carcinoma de endometrio seroso uterino. En realizaciones, las células cancerosas ErbB2-positivas son células cancerosas que sobreexpresan ErbB2 o portan un número de copias más elevado del gen ErbB2 en relación con una célula no cancerosa. En realizaciones, las células cancerosas ErbB2-positivas son células que expresan más ErbB2 que una referencia, como una célula del mismo tipo que no es cancerosa.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Datos que demuestran que la PEPD se une al subdominio 3 de ErbB2 ECD y promueve rápidamente la dimerización de ErbB2, **(a)** PEPD a 0,04 μM (+), 0,2 μM (++) o 1 μM (+++) se incubó con ErbB2/ECD-Fc (0,04 μM), ErbB3/ECD-Fc (0,04 μM), ErbB4/ECD-Fc (0,04 μM) o Fc (0,04 μM), se redujo con la proteína G-sefarosa, se separó mediante SDS-PAGE, y se tiñó con plata. **(b)** Unas células CHO-K1 fueron transfectadas con pCMV6-XL5-ERBB2 o con el vector vacío; 24 horas después, se prepararon lisatos celulares y se analizaron por electrotransferencia. En este caso, se utilizó gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y, en otra parte, como un control de carga, **(c)** unión de PEPD a ErbB2, medida mediante ELISA (n=3), utilizándose lisatos celulares de b; la misma cantidad de lisatos para todas las muestras (25 μg de proteína por muestra). Las barras de error indican DE. **(d)** ErbB2 y sus mutantes; todas las transfecciones de genes utilizaron la misma cantidad de ADN y duraron 24 h. Los lisatos celulares fueron analizados por electrotransferencia. **(e)** Unión de PEPD a ErbB2 y sus mutantes, medida mediante ELISA (n=3), utilizando lisatos celulares de d y una cantidad igual de ErbB2 o sus mutantes. Las barras de error indican DE. **(f) Las células CHO-K1** que de manera estable sobreexpresan ErbB2 (células CHO-K1/ErbB2) fueron tratadas con PEPD. Las células tratadas con PEPD y las células de control fueron tratadas seguidamente con el reticulante bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3) (2 mM, 30 min). Los lisatos celulares fueron analizados por electrotransferencia utilizando un anticuerpo de ErbB2.

Figura 2. Datos que muestran la activación y el agotamiento de ErbB2 mediante PEPD. **(a-c)** Las células fueron tratadas con PEPD o vehículo; los lisatos celulares fueron analizados por electrotransferencia. **(d) Las células** fueron tratadas con o sin PEPD (270 nM), utilizando ácido 4-aminofenilmercúrico (APMA) (1 mM) con control positivo. Los lisatos celulares y los medios fueron analizados por electrotransferencia. **(e) Las células** fueron tratadas con o sin PEPD (2,7 nM, 6 h), de las que se aisló el ARN para la RT-PCR. Se utilizó GAPDH como control. **(f) Las células** fueron tratadas con o sin PEPD (270 nM), seguido por tinción de inmunofluorescencia de ErbB2 y PEPD y microscopia confocal. Barra de la escala: 10 μM . **(g)** Las células fueron transfectadas con ubiquitina (pMT107-His-Ub) y 24 horas después se trataron con o sin PEPD (2,7 nM, 0,5 h). Los lisatos celulares fueron sometidos a incubación con un anticuerpo de ErbB2, reducidos con proteína G-agarosa y analizados por electrotransferencia.

Figura 3. Datos que demuestran que la PEPD activa directamente el ErbB2, que su función de dipeptidasa no está implicada. **(a) Las células** CHO-K1 fueron transfectadas con ErbB2 o con una mutante (todas ellas llevadas por pCMV6-XL5) y 24 horas después, tratadas con vehículo o con PEPD. Los lisatos celulares fueron analizados por electrotransferencia. **(b) Las células** CHO-K1 fueron transfectadas con ErbB2 y 24 horas después, tratadas con vehículo, PEPD o sus mutantes. Mayor información acerca de las mutantes se proporciona en la Figura 10. Los lisatos celulares fueron analizados por electrotransferencia.

Figura 4. Datos que muestran la falta de efecto de PEPD intracelular sobre ErbB2, pero se libera PEPD de la célula.

(a) Las células fueron transfectadas con un plásmido que expresa PEPD humana (pCMV6-XL5-PEPD) o con el vector vacío durante 24 h. Los lisatos celulares fueron analizadas por electrotransferencia. (b) Unas células fueron transfectadas con PEPD humana o con el vector vacío; 24 horas después, las células fueron lavadas y cultivadas en medio fresco ($\sim 1 \times 10^6$ células/2 ml de medio) durante otras 24 h, seguido por la recolección tanto de células como del medio. Los niveles de PEPD en los lisatos celulares fueron medidos por electrotransferencia, y la concentración de PEPD en el medio se midió mediante ELISA (n=3). Las barras de error indican DE.

Figura 5. Datos que muestran que la PEPD silencia la señalización de ErbB2-Src. (a, b) Unas células fueron tratadas con solvente o PEPD (2,7 nM). Los lisatos celulares fueron analizados por electrotransferencia. (c) Unas células fueron tratadas con o sin PEPD (2,7 nM, 0,5 h). Los lisatos celulares fueron sometidos a incubación con un anticuerpo de ErbB2, reducidos con proteína G-agarosa, y analizados por electrotransferencia. (d) Unas células fueron tratadas con o sin PEPD (2,7 nM) y seguidamente se midió la actividad de la Src quinasa y la actividad de la PI3K en los lisatos celulares (n=3). Las barras de error indican DE. (e) Unas células fueron tratadas con o sin PEPD (2,7 nM). Los lisatos celulares fueron analizadas por electrotransferencia. (f) Unas células fueron tratadas con pervanadato (30 μ M, 10 min) y a continuación con o sin PEPD (2,7 nM, 0,5 h). Los lisatos celulares fueron sometidos a incubación mediante un anticuerpo de PTEN, reducidos con proteína G-agarosa, y analizados por electrotransferencia. (g) Unas células fueron tratadas con solvente o con PEPD (2,7 nM, 1 h); se prepararon la fracción citosólica y la fracción de membrana y se las analizó por electrotransferencia. Tanto el GAPDH como el pro-TGF α se utilizaron como controles de carga.

Figura 6. Gráfico que muestra el paradigma de la modulación de ErbB2 por PEPD, y datos que muestran la inhibición selectiva de células que sobreexpresan ErbB2 mediante PEPD. (a) Tanto los monómeros como los dímeros fosforilados con tirosina existen en células que sobreexpresan ErbB2. La PEPD se une a ErbB2 como un homodímero; cada subunidad de PEPD se une a un ErbB2 ECD subdominio 3. La PEPD se une rápidamente a los dímeros ErbB2, silenciando la señalización de ErbB2 por el hecho de causar la disociación de Src respecto de ErbB2. La PEPD se une a los monómeros de ErbB2 un tanto lentamente, pero causa la dimerización y fosforilación de ErbB2, lo que conduce a la activación de la señalización corriente abajo. La PEPD también ocasiona un agotamiento fuerte y persistente de ErbB2 resultante de la internalización y degradación del ErbB2 inducidas por PEPD. (b) Unas células que crecían en placas de 6 cavidades fueron tratadas con vehículo o PEPD durante 48 h y a continuación se midió la síntesis de ADN mediante la incorporación de BrdU. (c) Unas células que crecían en agar blando en placas de 6 cavidades fueron tratadas con vehículo o con PEPD durante 21 días (con un cambio de medio cada 3-4 días) y seguidamente se examinaron para establecer la formación de colonias. (d) Unas células que crecían en cámaras de invasión fueron tratadas con vehículo o con PEPD durante 48 horas; se contaron las células que habían invadido a través de una membrana de Matrigel. Las barras de error en b-d indican DE (n=3).

Figura 7. Datos que muestran la unión de la neuregulina-1 (NRG-1) a los ECD de ErbB3 y ErbB4. NRG-1 a 0,2 μ M se incubó con Fc (0,04 μ M), ErbB3/ECD-Fc (0,04 μ M) o ErbB4/ECD-Fc (0,04 μ M), se redujo con proteína G-sefarosa, se separó mediante SDS-PAGE (15%) y se tiñó con plata. Esto demuestra que tanto ErbB3/ECD-Fc como ErbB4/ECD-Fc eran biológicamente funcionales con respecto a los resultados mostrados en la Figura 1.

Figura 8. Datos que muestran la validación de una línea celular utilizada en la presente divulgación, y la falta de unión de PEPD con las regiones transmembrana e intracelular de ErbB2 humano. (a) Unas células CHO-K1 fueron transfectadas transitoriamente con un plásmido que expresaba ErbB2 (pCMV6-XL5-ERBB2) o con el plásmido vacío durante 24 horas. Unas células de cáncer humano RT-4 y unas células de cáncer de mama humano MCF-7 quedaron sin tratar y fueron utilizadas como controles positivos para ErbB1, ErbB3 y ErbB4. Los lisatos celulares fueron analizados por electrotransferencia. GAPDH es un control de carga. (b) Unas células de CHO-K1 que expresaban establemente ErbB2 (células CHO-K1/ErbB2) fueron tratadas con APMA 1 mM durante 0,25 h. Los lisatos celulares fueron seguidamente preparados y analizados por electrotransferencia (el primer carril a la derecha). Los mismos lisatos celulares fueron mezclados con 1 μ M de PEPD, que fueron sometidos luego a incubación junto con un anticuerpo de PEPD o con una IgG de isotipo concordante, reducidos con proteína G-agarosa, y analizados por electrotransferencia. El resultado muestra que APMA causa la escisión de ErbB2 ECD, como se preveía, generándose el fragmento p95 (menos ECD), pero la PEPD solamente se coprecipita con el ErbB2 intacto, no el fragmento de p95, lo que indica que la PEPD no se une a las regiones transmembrana o intracelular de ErbB2.

Figura 9. No se observan efectos del factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor) y del NRG-1 sobre el ErbB2. (a, b) Unas células CHO-K1 que de manera estable sobreexpresaban ErbB2 humano (células CHO-K1/ErbB2) fueron tratadas con EGF recombinante o NRG-1 recombinante. Los lisatos celulares se prepararon seguidamente y se analizaron por electrotransferencia. (c, d) Con el fin de garantizar que tanto el EGF (ligando de ErbB1) como el NRG-1 (ligando de ErbB3 y ErbB4) que se utilizaron en nuestros experimentos fueran bioactivos, se los evaluó en células BT-474, que expresaban niveles relativamente bajos de ErbB1 y ErbB3. Como se preveía, el EGF estimuló significativamente la fosforilación de ErbB1, y el NRG-1 estimuló significativamente la fosforilación de

ErbB3.

Figura 10. Datos que muestran la configuración de PEPD humana y de sus mutantes, (a) PEPD humana de tipo salvaje y cambios de aminoácidos (aa) en sus mutantes. (b) PEPD humana recombinante de tipo salvaje y sus mutantes se generaron en bacterias, se purificaron utilizando cromatografía por afinidad de níquel y se analizaron mediante SDS-PAGE no reductor y tinción con plata. Observación: la carga de proteínas varía a lo largo de los carriles. En el carril indicado por "WT-PEPD + β ME", la PEPD de tipo salvaje se incubó con β -mercaptoetanol al 10% en PBS antes de la electroforesis no reductora en gel.

Figura 11. Datos que muestran la distribución de ErbB2 en las células. La fracción de membrana y los lisatos menos la membrana se prepararon a partir de células CHO-K1 que sobreexpresaban establemente ErbB2 humano (células CHO-K1/ErbB2) o se transfectaron de forma transitoria con ErbB2 (pCMV6-XL5-ERBB2) durante 24 h, y se analizaron por electrotransferencia. GAPDH y pro-TGF- α se utilizaron como controles de carga. Notablemente, en los experimentos descritos anteriormente (ver Figura 3), la PEPD o su mutante G278D no causaron una disminución en el nivel de proteína ErbB2, mientras que la PEPD causó un pronunciado agotamiento de ErbB2 en las células que de manera estable o constitutivamente sobreexpresan ErbB2 (ver las Figuras 2a y 2c). Encontramos que, en las células CHO-K1 que sobreexpresaban transitoriamente ErbB2, la mayoría de las moléculas de ErbB2 residen intracelularmente, mientras que en las células CHO-K1 que sobreexpresan ErbB2 de forma estable, la mayoría de las moléculas de ErbB2 se expresaban en la superficie celular, como se muestra aquí. Esto explica por qué el tratamiento con PEPD durante 3 h no causó una disminución clara de la proteína ErbB2 en las células que sobreexpresaban transitoriamente ErbB2 (ver la Figura 3).

Figura 12. Datos que muestran que la inducción de la fosforilación de ERK por PEPD en células CHO-K1 depende de ErbB2. Unas células CHO-K1 se transfectaron de forma transitoria con ErbB2 humano de tipo salvaje o con un mutante muerto en quinasa (ErbB2/K753M) durante 24 horas y luego se trataron con PEPD o vehículo, seguido de electrotransferencia.

Figura 13. Datos que muestran los efectos inhibitorios del crecimiento de la PEPD, G278D-PEPD y trastuzumab sobre células con o sin sobreexpresión de ErbB2. Unas células se cultivaron en placas de 96 cavidades (a razón de 500 células CHO-K1 o de células CHO-K1/ErbB2 por pocillo o 2.000 células BT-474 por pocillo; 150 μ L de medio por pocillo) durante la noche y luego se trataron con vehículo, PEPD, G278D-PEPD o trastuzumab en 200 μ L de medio por pocillo durante 72 h, seguido de incubación con bromuro de metiltiazolidifenil-tetrazolio (MTT) (9,2 mM en medio) a 37 °C durante 3 h. Después de remover el medio, las células fueron tratadas con dimetilsulfóxido (150 μ L por pocillo), y la densidad celular se determinó midiendo el formazano formado a partir de MTT espectroscópicamente a 570 nm (n = 3). Las barras de error indican DE.

Figura 14. Datos que muestran el impacto de un inhibidor de la coagulación de la sangre sobre los niveles plasmáticos de PEPD. (a) Se administró PEPD humana recombinante a ratones mediante inyección intraperitoneal a razón de 0,2 mg/kg de peso corporal o a razón de 10 mg/kg; los ratones fueron sacrificados a las 1, 6 o 24 h después de la dosificación de PEPD, y el nivel plasmático de PEPD se midió por ELISA junto con el de los ratones de control. (b) Enoxaparina (EP), un inhibidor de la coagulación de la sangre, se administró a ratones mediante inyección intraperitoneal a razón de 2,5 mg/kg una vez por día; 1 h después de la cuarta dosis de EP, se administró PEPD a los ratones mediante inyección intraperitoneal a razón de 0,2 mg/kg; los ratones fueron sacrificados 1 o 24 h después de la dosificación de PEPD, y el nivel de PEPD en plasma se midió por ELISA junto con el de los ratones de control. Cada valor es un valor medio \pm DE. El resultado muestra que la EP ayuda a elevar el nivel de PEPD en por lo menos 50 veces.

Figura 15. Datos que muestran los efectos de la PEPD y del inhibidor de coagulación EP *in vivo*. Unas células CHO-K1/ErbB2 fueron inoculadas por vía subcutánea en los flancos de ratones atímicos hembras (de 6-7 semanas de edad) a razón de 1×10^6 células por sitio en un pequeño volumen de mezcla de PBS:Matrigel. Comenzando 4 días después de la inoculación celular, se administró a los ratones un vehículo o una enoxaparina (EP) a razón de 2,5 mg/kg mediante inyección intraperitoneal una vez por día. Después de 3 días de tratamiento con EP (día 7 después de la inoculación celular), cuando el volumen del tumor llegó a aproximadamente 41 mm³, un subconjunto de ratones tratados con EP también se trató con PEPD a razón de 0,02 mg/kg o de 0,2 mg/kg por inyección intraperitoneal, que se administró tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). En los días en que se administraron tanto EP como PEPD, se administró PEPD 1 h después de EP. El volumen de los tumores se midió tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Los ratones fueron sacrificados 24 h después del último tratamiento (en el día 24 después de la inoculación celular, un total de 8 tratamientos con PEPD), y se tomaron muestras de sangre de los ratones para medir el nivel plasmático de PEPD mediante un ensayo ELISA. (a) Cada valor es una media \pm SEM (n = 8-11). (b) Cada valor es una media \pm DE (n = 3). La PEPD inhibió fuertemente el crecimiento de los tumores, pero la EP no tuvo efecto.

Figura 16. Datos que muestran los efectos de la PEPD y del inhibidor de la coagulación EP *in vivo*. Unas células CHO-K1 se inocularon por vía subcutánea en los flancos de ratones atímicos hembras desnudos (de 6-7 semanas de edad) a razón de 1×10^6 células por sitio en un pequeño volumen de mezcla de PBS:Matrigel. Comenzando 4 días después de la inoculación celular, los ratones fueron tratados con EP a razón de 2,5 mg/kg por inyección intraperitoneal una vez por día. Tres días después (día 7 después de la inoculación celular), cuando el volumen de los tumores alcanzó aproximadamente 26 mm^3 , los ratones también fueron tratados con vehículo o con PEPD a razón de 0,2 mg/kg por inyección intraperitoneal, que se administró tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes). En los días en que se administraron tanto EP como PEPD/vehículo, se administró PEPD/vehículo 1 h después de EP. El volumen del tumor se midió tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Los ratones fueron sacrificados 24 h después del último tratamiento que se administró en el día 21 después de la inoculación celular (un total de 7 tratamientos con PEPD), y se recogieron muestras de sangre de los ratones para medir el nivel plasmático de PEPD. (a) Cada valor es una media \pm SEM ($n = 8-11$). (b) Cada valor es la media \pm DE ($n = 3$). Esto muestra que la PEPD no se dirige a tumores sin sobreexpresión de ErbB2. Notablemente, estas células tumorales no expresan ErbB1, ErbB3 o ErbB4, como se muestra en la Figura 8a.

Figura 17. Datos que muestran una fuerte inhibición de los tumores mamarios ortotópicos por PEPD, pero una inhibición más fuerte de los tumores por PEPD enzimáticamente inactiva (PEPD^{G278D}). A unos ratones desnudos atímicos hembras (de 6-7 semanas de edad) se les implantó a cada uno por vía subcutánea (en la espalda) un pellet de liberación de 60 días de 17β -estradiol (1,7 mg de estradiol), antes de la inoculación ortotópica de células de cáncer de mama BT-474 en las almohadillas de grasa mamarias (a razón de 2×10^6 células por sitio en un pequeño volumen de mezcla de PBS:Matrigel). (a) Gráfico del tamaño del tumor a lo largo de días de crecimiento. Se administró EP (a razón de 0,5 mg/kg) diariamente mediante inyección intraperitoneal. En particular, EP a esta dosis fue tan efectiva como 2,5 mg/kg para elevar el nivel plasmático de PEPD. La dosis de EP siempre se inició 4 días antes que PEPD o PEPD^{G278D}. PEPD y PEPD^{G278D} se administraron tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes), cada una a razón de 2 mg/kg por inyección intraperitoneal. Cada valor es una media \pm SEM. (b) Gráfico que muestra la PEPD plasmática en vista de los tratamientos con EP, PEPD y PEPD^{G278D} en el día 58 del gráfico que se muestra en el panel a; cada valor es una media \pm DE.

Figura 18. Para la comparación de PEPD-Fc con PEPD para establecer el impacto sobre las señales en sentido descendente de ErbB2, unas células CHO-K1/ErbB2 tratadas con vehículo, PEPD-Fc (27 nM) o PEPD (27 nM) durante 3 o 6 h, seguido de un análisis de western blot. El híbrido humano PEPD Fc humano (Fc unido en el marco al extremo carboxilo de PEPD) fue preparado por nosotros utilizando tecnología recombinante estándar.

Figura 19. Datos que resumen la inhibición del tumor y los cambios moleculares en tumores tratados con rhPEPD o rhPEPD^{G278D}. rhPEPD o rhPEPD^{G278D} son las mismas que PEPD o PEPD^{G278D} o G278D-PEPD descritas anteriormente. Los tumores en varios grupos experimentales mostrados en la Figura 17 eran demasiado pequeños para el análisis molecular. (a) Tamaños de tumores derivados de xenoinjertos de células BT-474 en la almohadilla de grasa mamaria en el tratamiento con vehículo, EP, EP más rhPEPD o EP más rhPEPD^{G278D}. EP: diariamente a razón de 0,5 mg por kg de peso corporal por vía intraperitoneal, iniciado 4 días antes de rhPEPD o rhPEPD^{G278D}. rhPEPD o rhPEPD^{G278D}: a razón de 2 mg por kg de peso corporal por vía intraperitoneal, sólo dos dosis se separaron durante 2 días. Las barras de error son s.e.m. ($n = 3-6$). (b) Inmunotransferencias que comparan los principales cambios en la señalización celular en muestras de tumores obtenidas 24 h después de la dosis final como se indica en a. Cada muestra representa un tumor. (c, d) Actividad de SRC quinasa y actividad de PI3K en muestras tumorales obtenidas 24 h después de la dosis final como se indica en a. Las barras de error son DE ($n = 3$). (e) Inmunotransferencias que comparan los cambios de señalización de HIF-1 α en muestras de tumores obtenidas 24 h después de la dosis final como se indica en a. Cada muestra representa un tumor. Como el HIF-1 α y los factores relacionados (factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF] y transportador de glucosa 1 [GLUT-1]) son factores prosupervivencia, el resultado explica al menos en parte por qué rhPEPD^{G278D} es un agente antitumoral más potente que rhPEPD. Se cree que el efecto estimulador de la rhPEPD sobre estos factores prosupervivencia depende de su actividad de dipeptidasa. Tanto rhPEPD como rhPEPD^{G278D} están internalizadas por células tumorales (medida mediante su marca His, Figura 19e) aparentemente a través de ErbB2.

DESCRIPCIÓN DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en nuestros descubrimientos de que la PEPD es un ligando del receptor de ErbB2 y que se la puede usar para inhibir el crecimiento de cánceres ErbB2-positivos. En particular, y sin pretender estar restringido por ninguna teoría en particular, demostramos en la presente divulgación que la PEPD es un ligando de ErbB2 que se encuentra en el subdominio 3 del dominio extracelular de ErbB2. La PEPD se une a ErbB2 como un homodímero, estando cada subunidad aparentemente unida a un monómero de ErbB2. Cuando la PEPD se

une a los dímeros de ErbB2 preexistentes, silencia rápidamente el sistema de señalización de ErbB2-Src/CK2-PTEN-AKT. La PEPD también se une a los monómeros de ErbB2, causando la dimerización de ErbB2 y la fosforilación de tirosina. Sin embargo, la activación de ErbB2 por PEPD es aparentemente insignificante, porque la PEPD pronto causa un profundo agotamiento de ErbB2 debido a la internalización y degradación de ErbB2 y la PEPD inhibe selectivamente el crecimiento de las células que sobreexpresan ErbB2. También se cree a partir de los datos presentados en la presente que la PEPD afecta a ErbB2 solamente cuando se halla presente en el espacio extracelular y no implica su actividad enzimática. Por lo tanto, la presente divulgación incluye sin limitación las revelaciones de que la PEPD es un ligando del receptor de ErbB2, pero suprime la señalización de ErbB2; la actividad enzimática de la PEPD no está involucrada en el direccionamiento a ErbB2; la PEPD actúa sobre ErbB2 solamente cuando se halla presente en el espacio extracelular; y la PEPD inhibe selectivamente las células que sobreexpresan ErbB2. Los datos presentados en la presente demuestran que la PEPD y un derivado enzimáticamente inactivo de ella tienen efectos efectivos contra el cáncer anti-Erb2+ en modos de animales clínicamente relevantes. En particular, los datos presentados en la presente demuestran que la PEPD y una variante enzimáticamente inactiva de ella se dirige específicamente a los tumores que sobreexpresan ErbB2, y la supresión de los tumores Erb2+ se confirma en un modelo de tumor de mama ortotópico. Además, los datos presentados en la presente demuestran que las composiciones y los métodos de esta divulgación son eficaces para prevenir la recurrencia de al menos algunos tumores de Erb2+ después del cese del tratamiento con las formulaciones de PEPD.

La secuencia de aminoácidos de ErbB2 se proporciona en el número de acceso de GenBank NM_004448.2. Si bien las variantes en ErbB2 son conocidas en la técnica, se prevé que el presente método funcionará con cualquier variante de ErbB2, con la condición de que la variante ErbB2 tenga un dominio extracelular. El dominio extracelular es conocido en la técnica y comprende el número de aminoácido 23-652 en la secuencia de aminoácidos primaria en el número de acceso GenBank arriba mencionado.

Dicho con más detalle, será evidente a partir de la presente divulgación y de los ejemplos presentados en la presente que el efecto de la PEPD en la señalización de ErbB2 representa una novedosa señalización de ErbB2 inducida por ligando, así como también una novedosa función de la PEPD. Una ilustración gráfica no limitativa de esta relación se muestra en la Figura 6 que, sin pretender estar restringida por la teoría, demuestra cómo la inhibición selectiva de las células que sobreexpresan ErbB2 por la PEPD podría mostrar una utilidad terapéutica de la PEPD contra los cánceres de mama ErbB2-positivos y otros cánceres en humanos.

La PEPD es un ligando de afinidad relativamente elevada ($K_d = 7,3$ nM, Figura 1c) y ejerce un potente impacto en la señalización de ErbB2. La PEPD se une al subdominio 3 en ErbB2 ECD, aunque los residuos exactos involucrados en la unión permanecen indefinidos. Si bien anteriormente se indicó que ErbB2 ECD adopta una conformación fija que se asemeja a un estado activado por ligando, lo que lo deja listo para la homo- o heterodimerización en ausencia de unión directa al ligando (Cho FIS, et al. Nature 2003, 421(6924): 756-760), la presente divulgación indica que este modelo está incompleto. La PEPD provoca un apagado de señalización de ErbB2 de dos pasos. A los pocos minutos del tratamiento con PEPD, se desintegra el complejo de señalización preensamblado de ErbB2-Src-CK2. Tanto Src como CK2 se disocian de ErbB2 y se desactivan, lo que lleva a cambios en las señales corriente abajo; la desfosforilación de PTEN y su reubicación en la membrana celular, y la desfosforilación de AKT (probablemente debida a la desfosforilación de PIP3 por PTEN). Sin embargo, la PEPD no tiene efecto sobre PI3K lo que aparentemente se asocia con ErbB2 a través de ErbB3. Sin embargo, *in vivo* en los tejidos tumorales, la PEPD, así como también la PEPD^{G278D} silenciaron tanto ErbB3 como PI3K (Figura 19), aparentemente al interrumpir la asociación ErbB2-ErbB3, lo que no se detectó en nuestros estudios *in vitro* debido a los tiempos de tratamiento de PEPD relativamente cortos. Debido a que el impacto de PEPD sobre Src y CK2 se produce en ausencia de aparente agotamiento de ErbB2, la unión de PEPD al dímero ErbB2 probablemente cause un cambio de conformación de este último, haciéndolo incapaz de contener Src. La PEPD también se une al monómero ErbB2, causando la dimerización y activación de ErbB2, lo que se produce con cierta lentitud, ya que los niveles de fosforilación pico de ErbB2 y ERK se detectaron después de 3 horas de tratamiento con PEPD. Sin embargo, la activación de ErbB2 inducida por PEPD es probablemente insignificante en un sentido funcional, ya que la PEPD también causa un agotamiento profundo y sostenido de ErbB2, lo que se hizo evidente después de 1-3 h de tratamiento con PEPD y alcanzó el agotamiento máximo a las 6 h, que se mantuvo durante al menos 72 h. La PEPD fue capaz de causar un agotamiento casi completo de ErbB2 (Figura 2c). El agotamiento de ErbB2 inducido por PEPD parece ser el resultado total de la internalización y degradación de ErbB2, ya que la PEPD no tiene ningún efecto sobre la escisión de ErbB2 ECD, ni modula la expresión del gen de ErbB2. Por lo tanto, la presente divulgación revela una función fundamentalmente diferente y nueva de la PEPD. La PEPD era conocida como una dipeptidasa citosólica. Hemos aprendido ahora que no solamente la PEPD es un ligando de ErbB2, sino también una mutante de PEPD que pierde el 99,4% de su actividad de dipeptidasa es tan eficaz como la proteína de tipo salvaje. Además, *in vivo*, la mutante PEPD es más eficaz que la misma PEPD para combatir los tumores impulsados por ErbB2 (Figura 17). La PEPD intracelular no tiene efecto sobre ErbB2, pero la PEPD se libera de las células como se revela en la presente divulgación, y se libera más PEPD de los tejidos y células dañados.

Se prevé que las composiciones que comprenden PEPD sean útiles para la prevención y/o la terapia del cáncer de mama ErbB2-positivo y de otros cánceres en seres humanos. De manera compatible con su capacidad de silenciar rápidamente la vía de señalización de ErbB2-Src/CK2-PTEN-AKT, que desempeña un papel importante en el cáncer de mama impulsado por ErbB2, y para causar una disminución pronunciada y persistente de ErbB2, demostramos que la PEPD inhibe significativamente la proliferación, la formación de colonias independientes del anclaje y la invasión/migración de células que sobreexpresan ErbB2, ejerciéndose al mismo tiempo poco impacto sobre las células que tienen una expresión mínima de ErbB2 y, como se describió anteriormente y con más detalles a continuación, demostramos los efectos anticancerígenos de la PEPD y de un derivado enzimáticamente inactivo de la misma, mediante la utilización de modelos animales clínicamente relevantes portadores de tumores de ErbB2+. El impacto inhibitorio de la PEPD sobre ErbB2 contrasta con el conocido efecto estimulador de otros ligandos de ErbB sobre sus receptores. El impacto de la PEPD sobre la señalización de ErbB2 y sobre las células que sobreexpresan ErbB2 recuerda el del trastuzumab. Dado el elevado costo del uso del trastuzumab en la clínica (el costo actual es superior a los \$ 1.000 por dosis y de alrededor de \$ 70.000 para un curso completo de tratamiento). La PEPD tiene la ventaja de que puede producirse en masa como se describe con más detalle a continuación a un costo relativamente bajo y, por lo tanto, se prevé que en determinadas realizaciones sea una alternativa significativa y menos costosa al trastuzumab. *In vivo*, el trastuzumab ni regula hacia abajo la expresión de ErbB2 ni inhibe la fosforilación de la tirosina de ErbB2 en tejidos cancerosos (Gennari et al., Clin Cancer Res, 10, 5650-5655, 2004; Gijzen et al., PLoS Biol, 8, e1000563, 2010); en cambio, su actividad antitumoral depende principalmente de la citotoxicidad mediada por las células dependiente del anticuerpo (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) por intermedio de dominio Fc (Barok et al., Mol Cancer Ther, 6, 2065-2072, 2007; Clynes et al., Nature Med, 6, 443-446, 2000). Por lo tanto, la PEPD o su mutante pueden complementar el trastuzumab y superar hasta cierto punto la resistencia al trastuzumab en pacientes.

Se prevé que la PEPD sea adecuada para uso en las composiciones y métodos de la presente divulgación. En realizaciones, la PEPD es una PEPD producida por un procarionota o un eucariota. En realizaciones, la PEPD es de origen procarionota. En realizaciones no limitantes, la PEPD es producida por *Pseudoalteromonas haloplanktis* (es decir, una PEPD que comprende la secuencia de aminoácidos de GenBank no. AAA99824.1), o *Pyrococcus furiosus* (es decir, una PEPD que comprende la secuencia de aminoácidos de GenBank n.º WP_011011876.1). En la técnica también se conocen varias secuencias de aminoácidos de PEPD eucarióticas, lo que incluye varias secuencias de aminoácidos de PEPD de mamíferos. En realizaciones, la PEPD tiene la secuencia de la PEPD de un roedor, es decir, de un ratón o rata, o de la PEPD de un primate no humano, tal como el chimpancé o un macaco Rhesus. La secuencia de aminoácidos de la prolidasa de ratón se proporciona bajo el número de acceso de GenBank. NP_032846.2; la prolidasa de rata se proporciona bajo NP_001009641.1; la prolidasa de Rhesus macaco se proporciona bajo AFJ71215.1; la prolidasa de chimpancé se proporciona bajo el NP_001267459.1. La secuencia de aminoácidos de la prolidasa humana (PEPD) en la SEQ ID NO: 1 es conocida en la técnica. La SEQ ID NO: 1 y la secuencia de cADN que lo codifica es accesible bajo el número de acceso de GenBank. J04605.1; la secuencia de aminoácidos también se proporciona bajo el número de acceso AAA60064 de GenBank. En una realización ilustrativa pero no limitativa, la PEPD humana enzimáticamente activa tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1:

MAAATGPSFWLGNLTKVPLALFALNRQLCERLRKNPVQAGSIVVLQGGEETQ
 RYCTDTGVLFLQESFFHWAFGVTEPGCYGVIVDVTGKSTLFPRLPASHATWMGKI
 HSKEHFKEKYAVDDVQYVDEIASVLTSQKPSVLLTLRGVNTDSGSVCREASFDGIS
 KFEVNNLILHPEIVESRVFKTDMLEVLRYTNKISSEAHREVMKAVKVGKEYGLES
 LFEHYCYSRGGMRHSSYTCICGSGENSAVLHYGHAGAPNDRTIQNGDMCLFDMG
 GEYYSVASDITCSFPRNGKFTADQKAVYEAVLLSSRAVMGAMKPGDWWPIDRLA
 DRIHLEELAHMGILSGSVDAMVQAHLGAVFMPHGLGHFLGIDVHDVGGYPEGVERI
 DEPLRLSLRTARHLQPGMVLTVEPGIYFIDHLLDEALADPARASFLNREVLQRFGRF
 GGVRIEEDVVVIDSGIELLTCVPRTVEEIEACMAGCDKAFTPFSGPK (SEQ ID NO:1)

En la SEQ ID NO: 1, la G en la posición 278 está sombreada, en negrita y en cursiva y representa la ubicación de una mutación G278D que hace que la PEPD quede inactiva enzimáticamente. En realizaciones, la mutación es un cambio de glicina en la posición 278 a un aminoácido distinto del ácido aspártico.

Todas las secuencias de aminoácidos y de polinucleótidos proporcionadas bajo los números de acceso de GenBank a los que se hace referencia en esta divulgación son aquellas secuencias disponibles por intermedio de GenBank en la fecha de presentación de esta solicitud. Esta descripción también incluye todos los polinucleótidos que codifican la PEPD y todas las variantes de la misma que se describen en la presente o que de otra manera serían conocidas por el experto en la técnica dado el beneficio de la presente divulgación.

Las secuencias de aminoácidos de PEPD en roedores (ratón y rata) tienen una similitud de más del 86% con la secuencia humana, mientras que las secuencias de aminoácidos de PEPD de primates no humanos, tales la del macaco Rhesus, son más del 95% similares a la secuencia de aminoácidos PEPD humana. En realizaciones, la PEPD 5 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de PEPD humana. En realizaciones, la PEPD usada en las composiciones y/o métodos de la presente divulgación tiene una similitud de entre al menos el 85,0% y el 99,9%, inclusive, e incluye todos los números hasta el primer lugar decimal entre ellos, con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En una realización, la PEPD comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una similitud de al menos el 95% con respecto a la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

10 En diversas realizaciones, la presente divulgación incluye composiciones que comprenden PEPD de tipo salvaje (por ejemplo, PEPD de la SEQ ID NO: 1), o PEPD modificada, o una combinación de ellas. En general, los expertos en la técnica pueden determinar las modificaciones a la PEPD adecuadas para su uso con la presente invención, utilizando técnicas comunes, dado el beneficio de la presente divulgación. En realizaciones, la PEPD modificada comprende 15 modificaciones de la SEQ ID NO: 1. La divulgación incluye todas las modificaciones de la SEQ ID NO: 1 con la condición de que la PEPD conserve su capacidad de unirse y causar el agotamiento de ErbB2 de la superficie celular. En realizaciones, la PEPD modificada conserva la capacidad de formar un homodímero. En realizaciones, la puesta en contacto de una célula ErbB2-positiva con una PEPD modificada (o de tipo salvaje) de esta divulgación es seguida por la unión de ErbB2 y la endocitosis de ErbB2, dando como resultado el agotamiento de ErbB2. La PEPD modificada 20 que conserva algunos de estos atributos funcionales, o todos ellos, puede comprender inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, la divulgación incluye PEPD que ha sido modificada por sustituciones de aminoácidos conservadoras que en términos generales se basan en la similitud relativa entre los sustituyentes del grupo R. Los ejemplos no limitantes de tales sustituciones incluyen gly o ser en lugar de ala; lys en lugar de arg; gln o his en lugar de asn; glu en lugar de asp; ser en lugar de cys; asn en lugar de gln; asp en lugar de glu; ala en lugar de 25 gly; asn en lugar de his; leu o val en lugar de ile; ile o val en lugar de leu; arg en lugar de lys; leu o tyr en lugar de met; thr en lugar de ser; tyr en lugar de trp; phe en lugar de tyr; e ile o leu en lugar de val. Por lo tanto, se incluye en la descripción una PEPD que comprende cualquier sustitución de aminoácido conservadora única, o cualquier combinación de sustituciones de aminoácido conservadoras, con la condición de que puedan al menos conservar la capacidad de unirse a ErbB2, con el subsiguiente agotamiento de ErbB2 de la superficie celular. Será evidente para 30 los expertos en la técnica cómo determinar si una PEPD modificada particular puede unirse o no a ErbB2. En realizaciones, la PEPD modificada puede unirse al dominio extracelular de ErbB2 con un valor Kd estimado de 7,3 nM, determinado mediante un ensayo ELISA.

La PEPD de tipo salvaje es enzimáticamente activa. La PEPD modificada es una PEPD que comprende un cambio en 35 la SEQ ID NO: 1 y puede ser enzimáticamente activa o enzimáticamente inactiva. En este sentido, se sabe en la técnica que los defectos en la actividad de iminodipeptidasa de la PEPD están asociados con la deficiencia de polidasa, que es una enfermedad autosómica recesiva muy rara asociada con el metabolismo del colágeno y que afecta a los tejidos conectivos. Por lo tanto, se sabe que la actividad enzimática de la PEPD es importante. Sin embargo, en realizaciones, se usa PEPD enzimáticamente inactiva en las composiciones y métodos de esta descripción. Se 40 considera que la PEPD enzimáticamente inactiva es una PEPD que presenta menos hidrólisis de un sustrato dipéptido que tiene prolina o hidroxiprolina en su terminal carboxi que la cantidad de dicha hidrólisis presentada por una proteína de referencia que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En realizaciones, la PEPD enzimáticamente inactiva puede tener al menos entre el 0,0% y el 99,9%, inclusive, incluyéndose todos los dígitos allí entre el primer punto decimal, menos actividad de hidrólisis dipeptídica en comparación con una PEPD de referencia. 45 En una realización, una PEPD inactiva enzimáticamente no tiene más del 0,6% de actividad de hidrólisis dipeptídica de una PEPD de referencia. En una realización, la PEPD de referencia comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Una unidad de actividad de la polidasa puede definirse como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de prolina/h en condiciones de ensayo estándar. En una realización, una PEPD inactiva enzimáticamente no tiene actividad de hidrólisis dipeptídica de PEPD detectable. En una realización, una PEPD inactiva enzimáticamente 50 comprende una mutación G278D. En realizaciones, la divulgación incluye una mutación cualquiera, o cualquier combinación de mutaciones de PEPD descritas en la presente, y en consecuencia incluye la condición de que cualquier combinación única o cualquiera de tales mutantes puede ser excluida de la invención.

La PEPD utilizada en las realizaciones de esta divulgación puede incluir modificaciones que mejoren sus 55 características deseables, tales como la capacidad de unirse o ingresar en una célula tumoral o entorno tumoral, o para mejorar su tiempo de circulación, biodisponibilidad, estabilidad o los usos relacionados con la destrucción dirigida a células ErbB2-positivas, la formación de imágenes de células ErbB2-positivas. Las proteínas PEPD que pueden usarse con la presente divulgación incluyen un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o una modificación de la misma, y en realizaciones también incluyen tales polipéptidos PEPD dentro del contexto de un polipéptido más grande. 60 Las modificaciones a la SEQ ID NO: 1 incluyen modificaciones que anulan o disminuyen la actividad enzimática y/o

cambios que no afectan la capacidad de la PEPD modificada para unirse a ErbB2. Por lo tanto, la PEPD de la SEQ ID NO: 1 puede modificarse mediante sustituciones de aminoácidos conservadoras que se basan generalmente en la similitud relativa entre los sustituyentes del grupo R. Los ejemplos no limitativos de tales sustituciones contempladas incluyen sin limitación: gly o ser en lugar de ala; lys en lugar de arg; gln o his en lugar de asn; glu en lugar de asp; ser en lugar de cys; asn en lugar de gln; asp en lugar de glu; ala en lugar de gly; asn o gln en lugar de his; leu o val en lugar de ile; ile o val en lugar de ala; arg en lugar de lys; leu o tyr en lugar de met; thr en lugar de ser; tyr en lugar de tyr; e ile or leu en lugar de val. Por lo tanto, las PEPD que comprenden cualquier sustitución de aminoácidos conservadora única, o cualquier combinación de sustituciones de aminoácidos conservadoras, se incluyen en esta divulgación, siempre que conserven sus propiedades de unión a ErbB2 y puedan inhibir el crecimiento de células ErbB2-positivas. Por lo tanto, la presente divulgación incluye secuencias polipeptídicas que comprenden la SEQ ID NO: 1 o modificaciones de la misma, y pueden incluir modificaciones adicionales, que incluyen sin limitación aminoácidos adicionales, y/o que se proporcionan como parte de un complejo con otras composiciones de material. Por lo tanto, los polipéptidos PEPD podrían ser parte de proteínas más grandes, tales como las proteínas de fusión, o podrían estar conectados a otros restos. Por consiguiente, las proteínas PEPD podrían asociarse covalente o no covalentemente con cualquier resto deseable del que se prevería que mejorará sus capacidades funcionales de acuerdo con la prevención y/o terapia de los cánceres ErbB2-positivos.

En general, la proteína PEPD (y, si se desea, una secuencia polipeptídica con el que se hace como una proteína de fusión única) puede hacerse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, en realizaciones, la proteína PEPD/proteína de fusión puede prepararse usando sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Por lo tanto, la divulgación proporciona ventajas de fabricación sobre otros socios de unión de ErbB2, tales como los mAbs dirigidos a ErbB2, que son costosos y requieren mucho tiempo para su preparación. En general, para la producción recombinante de proteínas que comprenden o consisten en una PEPD como se describe en la presente, cualquier polinucleótido que codifica la PEPD se puede proporcionar en un vector de expresión. La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende secuencias de control de expresión proteínicas operativamente vinculadas a la secuencia de codificación de la PEPD. El vector de expresión puede comprender elementos que actúan en cis para la expresión, incluidos sin limitación, los elementos promotores, elementos potenciadores, orígenes de replicación, marcadores seleccionables, sitios de inicio de la transcripción, secuencias que codifican sitios de inicio de la traducción y cualquier otra secuencia que sea deseable para la expresión de proteínas, en función del sistema de expresión elegido. Los vectores de expresión de proteínas adecuados que pueden diseñarse para expresar cualquier secuencia polinucleotídica que codifica una PEPD (cada una de las cuales secuencias codificadoras de PEPD están incluidas en esta divulgación) incluyen todos los conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales incluyen sin limitación, los cósmidos, plásmidos y sistemas basados en virus que incorporan el polinucleótido recombinante que codifica la PEPD. El sistema utilizado para expresar las proteínas PEPD recombinantes de la invención puede ser cualquier organismo adecuado e incluye sin limitación, los sistemas de expresión de células de mamíferos, sistemas de expresión de células de insectos (por ejemplo, sistemas basados en baculovirus), sistemas de expresión de levaduras, sistemas de expresión de células vegetales, y sistemas de expresión procariotas. En una realización, se usa *E. coli* para la expresión de la PEPD. En una realización, una proteína quimérica PEPD se expresa de forma recombinante utilizando un sistema de expresión de mamíferos, de modo que la proteína quimérica comprende glicosilación específica para humanos.

En una realización, una proteína PEPD puede conjugarse con una inmunoglobulina (Ig) o con un fragmento de la misma para proporcionar una molécula de PEPD/Ig quimérica. Se prevé que un constructo de este tipo sea útil para involucrar diversos aspectos de la respuesta inmune del individuo para facilitar la destrucción selectiva de las células ErbB2+. La inmunoglobulina, o fragmento de la misma, puede ser de cualquier tipo o subtipo de Ig. En este sentido, estudios previos han indicado que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (mediada a través de los receptores Fc) desempeña un papel fundamental en el direccionamiento del trastuzumab en el cáncer de mama ErbB2-positivo (Clynes et al., *Nature Med*, 6, 443-446, 2000; Spiridon et al., *Clin Cancer Res*, 10, 3542- 3551, 2004). La presente divulgación también abarca proteínas quiméricas PEPD-Fc y composiciones farmacéuticas que las comprenden. Los métodos para preparar proteínas quiméricas Fc son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los vectores pFUSE-Fc, disponibles comercialmente en InvivoGene, se pueden usar para generar híbridos de fusión PEPD-Fc. Por lo tanto, en una realización, la divulgación incluye una composición que comprende una proteína de fusión, en donde la PEPD en un componente de la proteína de fusión, y en donde la proteína de fusión comprende una región Fc de una Ig humana. En diversas realizaciones, la región Fc es una región Fc o sus fragmentos son de un anticuerpo IgA, IgG o IgE, aunque también se pueden usar regiones Fc de otros tipos de anticuerpos o regiones Fc sintéticas/artificiales. En realizaciones, la región Fc es una IgG2a humana o IgG1 humana o un fragmento de tales regiones Fc. La región Fc puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una región Fc producida por un mamífero, tal como un ser humano. En diversas realizaciones, la región Fc puede tener entre el 80% y el 100% (incluyendo todos los números enteros entre ellos) de similitud de secuencia de aminoácidos con una región Fc producida por un ratón y/o un humano. La región Fc puede ser una región Fc intacta, lo que significa

una región Fc completa, o puede ser un fragmento de la región Fc. Los expertos en la materia reconocerán que la expresión "región Fc" de un anticuerpo significa la región de "fragmento cristalizante" del anticuerpo, que comprende dos cadenas pesadas que contribuyen con dos o tres dominios constantes (CD, constant domain), según la clase del anticuerpo. Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones Fc, así como las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc para inmunoglobulinas humanas y de ratón son bien conocidas en la técnica. En una realización, la porción Fc de las proteínas de fusión comprende sólo una o más cadenas pesadas de anticuerpo. Los expertos en la técnica reconocerán que para la demostración de la invención usando modelos animales murinos, la porción Fc de la proteína de fusión puede ser una porción de Ig murina IgG2a o IgG2b Fc, mientras que para la terapia y/o prevención de la enfermedad en humanos, es preferible que la porción Fc sea una porción de IgG1 o de IgG3 Fc. En ciertas realizaciones, la porción Fc de las proteínas de fusión proporcionadas en la presente no incluye porciones de reconocimiento de antígeno (es decir, la porción de anticuerpo de las proteínas de fusión no contiene regiones variables de anticuerpo). Por lo tanto, las proteínas de fusión distintas de los anticuerpos que contienen porciones de unión a antígeno. Los constructos de ADN que codifican las proteínas PEPD de fusión Fc se pueden hacer usando cualquier técnica convencional bien conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los constructos de codificación de fusión Fc-30 pueden hacerse utilizando reactivos disponibles comercialmente. Por ejemplo, INVIVOGEN ofrece la familia de plásmidos pFUSE-Fc desarrollada para facilitar la construcción de proteínas Fc-Fusión mediante la fusión de una secuencia que codifica una proteína dada a la región Fc de una inmunoglobulina (Ig). En este constructo, la región Fc comprende los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada de IgG y la región bisagra. La bisagra actúa como un espaciador flexible entre las dos partes de la proteína de fusión Fc, lo que permite que cada parte de la proteína de fusión funcione independientemente si así se desea.

Como se describió anteriormente, la divulgación incluye cualquier proteína PEPD como un componente de una proteína de fusión que puede incluir cualquier otra secuencia de aminoácidos que sería deseable para expresarse en el mismo marco de lectura abierto que la proteína PEPD, y puede incluir, sin limitación, secuencias de aminoácidos que intervienen en facilitar el aislamiento y/o purificación de proteínas, para solubilidad, secreción o cualquier otra función. El polipéptido PEPD puede configurarse N-terminal o C-terminalmente al marco de lectura abierto fusionado, en función de la proteína de fusión particular que se produzca. Por ejemplo, las proteínas PEPD se pueden proporcionar con una marca de histidina, como una marca de polihistidina adecuada. En realizaciones, la marca de histidina comprende al menos seis histidinas en secuencia. En una realización, la marca his es una secuencia peptídica de hexa-histidina. En una realización, si se desea, se puede configurar un sistema de expresión de PEPD para que se pueda eliminar la marca de histidina, por ejemplo, mediante la inclusión de una marca de hexa-histidina N-terminal escindible por el virus del tabaco (TEV, Tobacco etch virus).

En realizaciones no limitantes, los polipéptidos PEPD pueden combinarse o acoplarse con un agente quimioterapéutico, u otro agente que tenga una actividad citotóxica, o con agentes que sean útiles para la detección y/o formación de imágenes de células/tejidos ErbB2-positivos. Por ejemplo, los conjugados de PEPD pueden incluir toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas o moléculas pequeñas. Las toxinas enzimáticamente activas adecuadas y las moléculas pequeñas incluyen sin limitación, docetaxel, mitoxantrona, taxanos, la cadena A de la difteria, fragmentos no vinculantes activos de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas Phytolaca (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcuma, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina enomicina y los tricotecenos, agentes dirigidos a los microtúbulos, o cualesquier uno o más agentes antiangiogénicos.

Los conjugados y las combinaciones de la proteína PEPD y los agentes quimioterapéuticos (u otros agentes, como los agentes de imagen) pueden prepararse utilizando cualquier técnica adecuada. En diversas realizaciones, la proteína PEPD puede producirse por separado del agente quimioterapéutico, y luego acoplarse químicamente a él, o en el caso de agentes proteicos, la proteína PEPD puede producirse como una PEPD/proteína de fusión para producir una nueva proteína quimérica. Para el acoplamiento químico, se dispone de una variedad de proteínas bifuncionales. agentes de acoplamiento tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (tales como el suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como el glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y los compuestos bis-activos de flúor (tales como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobencono), para unir covalentemente una PEPD y un agente quimioterapéutico u otro agente, tal como un agente de imagen.

En otra realización, la PEPD puede conjugarse con un agente radioactivo. Se dispone de una variedad de isótopos radiactivos para conjugar con proteínas, de manera tal que las células o tejidos ErbB2-positivos a los que se une la PEPD, pueden ser puestos en imagen o destruidos. Para la destrucción selectiva de células, los péptidos pueden

conjugarse con un átomo altamente radioactivo, como At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212 e isótopos radiactivos de Lu. Para identificar células ErbB2-positivas, los conjugados de PEPD pueden incluir un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo, Tc99m (tecnecio-99 metaestable), I123, o una marca de giro para resonancia magnética nuclear y/o imágenes de resonancia magnética, tales como I123, I131, In111, F19, C13, N15, O17 o gadolinio (III) o manganeso (II). Las radiomarcaciones pueden incorporarse en las proteínas PEPD de maneras conocidas.

Las proteínas PEPD pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticas para su administración combinándolas con cualquier vehículo, excipiente y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos adecuados de portadores, excipientes y estabilizadores farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (2005), 21.^a edición, Filadelfia, PA, Lippincott Williams & Wilkins. Además, se puede usar cualquier vehículo de administración adecuado en la invención, tal como una formulación de administración de liberación controlada en la que la PEPD se libera durante un período de tiempo. Si se desea, la composición farmacéutica puede comprender tanto PEPD como un inhibidor de la coagulación.

La administración de formulaciones que comprenden PEPD descritas en la presente puede llevarse a cabo utilizando cualquier vía de administración adecuada, lo que incluye, entre otras, la parenteral, intraperitoneal, intrapulmonar, oral e intratumoral. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y subcutánea.

Los expertos en la técnica pueden determinar la cantidad de PEPD y de cualquier otro agente activo que se incluirá en una composición y/o que se usará en el método, dado el beneficio de la presente divulgación. Por lo tanto, en una realización, se administra una cantidad eficaz de una composición de la invención. Una cantidad efectiva puede ser una cantidad de la composición que inhibe el crecimiento de células en el individuo que expresa ErbB2, o una cantidad que prolongue la supervivencia del individuo, o que alivie los síntomas de la enfermedad asociados con la expresión del ErbB2 en el individuo, o que suprima un fenotipo maligno de células que sobreexpresan ErbB2. En realizaciones, en cuanto al individuo al que se va a administrar una composición de la invención tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar y/o de recaer en un cáncer ErbB2-positivo. En realizaciones, el cáncer ErbB2-positivo es un cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de estómago o formas agresivas de cáncer uterino, tales como el carcinoma endometrial seroso uterino u otros cánceres que sobreexpresan ErbB2, o cánceres cuyas células madre sobreexpresan ErbB2, o cánceres metastásicos que sobreexpresan ErbB2.

Las dosis adecuadas para fines terapéuticos o preventivos pueden ser determinadas por los expertos en la técnica y se basarán, al menos en parte, en la consideración de la edad, el sexo, el tamaño y la salud del individuo, el tipo de sistema de administración utilizado, la etapa de la enfermedad, y otros factores que serán evidentes para el experto en la técnica. En realizaciones, la dosificación de PEPD para sujetos humanos puede ser similar o igual a la dosificación para trastuzumab, que es típicamente de 2-4 mg/kg por semana.

Las composiciones de la divulgación pueden administrarse junto con cualquier régimen de tratamiento convencional, lo que incluye la administración secuencial o simultánea de agentes quimioterapéuticos, inmunoterapias pasivas, vacunas, adyuvantes y similares. El método puede realizarse junto con terapias convencionales que están destinadas a tratar una enfermedad o trastorno asociado con células ErbB2-positivas. Por ejemplo, la administración de las composiciones descritas en la presente puede combinarse con modalidades de tratamiento que incluyen, sin limitación, quimioterapias, intervenciones quirúrgicas y radioterapia, que pueden realizarse antes, simultáneamente o después de, las administraciones de PEPD. En realizaciones, la divulgación incluye una composición que comprende PEPD y cetoximab, un anticuerpo monoclonal utilizado clínicamente contra ErbB1. En realizaciones, la divulgación incluye una composición que comprende PEPD con el inhibidor de quinasa de ErbB1/ErbB2 dual utilizado clínicamente, el lapatinib. En realizaciones, la divulgación incluye composiciones que comprenden PEPD y trastuzumab. En realizaciones, la divulgación incluye composiciones que comprenden PEPD y pertuzumab, otro anticuerpo monoclonal anti-ErbB2 utilizado clínicamente.

En realizaciones, la divulgación incluye composiciones y composiciones para uso en métodos, en donde además de una proteína PEPD, las composiciones comprenden un inhibidor de la coagulación sanguínea. En una forma de realización, el inhibidor de la coagulación es un agente que inhibe la degradación de PEPD in vivo, para reducir la dosis de PEPD requerida por los pacientes. En una forma de realización, el inhibidor de la coagulación inhibe la conversión de protrombina en trombina, o inhibe la participación de la trombina en la formación de coágulos. En una forma de realización, el inhibidor de la coagulación interfiere en la función relacionada con la coagulación de las proteínas promotoras de coágulos conocidas como factor X y factor II. En realizaciones, el inhibidor de la coagulación se une y activa la antitrombina III, y como consecuencia, se inhiben los factores de coagulación Xa y IIa. En una forma de realización, el inhibidor de la coagulación es heparina, tal como una preparación de heparina no fraccionada, o un

una forma de heparina de peso molecular bajo. Las formas de heparina de peso molecular bajo son conocidas en la técnica (es decir, Weitz JI; Weitz, Jeffrey I. (1997). "Low-molecular-weight heparins", N Engl J Med 337 (10): 688-98). En una forma de realización, la heparina de bajo peso molecular es enoxaparina o una sal farmacéuticamente aceptable de esta, tal como enoxaparina sódica. En una forma de realización, el inhibidor es un inhibidor directo de Xa, ya sea oral o no oral, que incluye, pero sin limitación, los fármacos vendidos con las marcas RIVAROXABAN, APIXABAN o EDOXABAN. En una forma de realización, el inhibidor de la coagulación puede ser un inhibidor de otros factores de coagulación de la sangre, que incluye, pero sin limitación, los Factores XII, XI y VII. En realizaciones, la heparina de bajo peso molecular u otro inhibidor de la coagulación se administra usando cualquier vehículo y vía de administración adecuados. En realizaciones, el inhibidor de la coagulación se administra por inyección subcutánea.

5 En una forma de realización, el inhibidor de la coagulación se administra por vía oral. La dosis del inhibidor de la coagulación se puede basar en el peso del receptor individual y otros parámetros que serán reconocidos por los expertos en la técnica dado el beneficio de esta divulgación. En realizaciones, el inhibidor de la coagulación se puede administrar antes, de forma concurrente con o después de la composición de PEPD, y se puede administrar con el mismo número y tiempo de administración de PEPD, o se puede administrar de acuerdo con un esquema que es

10 diferente de la administración de PEPD.

15

La presente divulgación proporciona un método para identificar si un individuo es candidato para el tratamiento con una composición que comprende una PEPD. El método comprende obtener una muestra biológica del individuo y determinar si la muestra comprende células cancerosas ErbB2-positivas, en donde la determinación de que la muestra biológica comprende células cancerosas ErbB2-positivas es indicativo de que el individuo es un candidato para el tratamiento, y en donde la determinación de que la muestra biológica no comprende células cancerosas ErbB2-positivas es indicativo de que el individuo no es candidato para el tratamiento. Por lo tanto, la presente divulgación puede proporcionar ayuda en el diagnóstico, o para diagnosticar a un individuo que necesita un tratamiento con una composición que comprende una PEPD. El método puede comprender comunicar una determinación de la presencia

20 o ausencia de células cancerosas ErbB2-positivas en la muestra biológica a un proveedor de atención médica, de modo que el proveedor de atención médica pueda recomendar el tratamiento con una composición que comprende una PEPD. El método puede comprender, además, administrar al individuo una composición que comprende una PEPD. Una determinación de la presencia de células cancerosas ErbB2-positivas comprende detectar en un individuo o una muestra biológica obtenida del individuo, las células cancerosas que sobreexpresan ErbB2.

25

30 El método para identificar si un individuo es candidato para el tratamiento con una composición que comprende una PEPD puede comprender obtener una muestra biológica del individuo y determinar si la muestra comprende células cancerosas ErbB2-positivas y/o sobreexpresa ErbB2 mediante el contacto de la muestra con una PEPD marcada de forma detectable. La detección de un complejo de ErbB2+ y una PEPD marcada de forma detectable es indicativa de

35 que el individuo es un candidato para el tratamiento con una composición que comprende PEPD como se describe en la presente. El complejo de ErbB2+ y PEPD marcada de manera detectable se puede detectar en una biopsia de un tumor que se sospecha de que comprende células ErbB2-positivas. Alternativamente, la PEPD unida a una célula ErbB2-positiva se puede detectar utilizando un compañero de unión de PEPD marcada de forma detectable. Las células cancerosas ErbB2-positivas pueden expresar más ErbB2 que una célula de referencia. La referencia puede ser cualquier referencia adecuada, tal como un control apareado, un valor estandarizado (es decir, un área por debajo

40 de una curva) y/o valores para las cantidades de ErbB2 expresadas por una célula del mismo tipo de tejido en una muestra, en donde las células ErbB2 no son células cancerosas. En general, la identificación de un sujeto humano como candidato para el tratamiento con una formulación de PEPD se realiza utilizando el mismo criterio o similar al de identificar a un individuo como candidato para el tratamiento con trastuzumab, que se basa en parámetros clínicamente

45 establecidos y conocidos por el profesional experto. Por ejemplo, la inmunohistoquímica (IHC) se usa con frecuencia para medir la cantidad de ErbB2 presente en una muestra de biopsia tumoral o, alternativamente, la hibridación con fluorescencia in situ (FISH) se usa para medir el número de copias del gen (ver, por ejemplo, Carlson RW et al., J Natl Compr Cane Netw 2006, Suppl 4, S1-22; Her2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations). Un tumor con una puntuación de IHC de 0 o 1+, una relación promedio de gen ErbB2/cromosoma

50 17 menor de 1,8, o un número promedio de copias del gen/célula de ErbB2 de 4 o menor según lo determinado por FISH se considera negativo para ErbB2. Una muestra de tumor con una puntuación IHC de 3+, una relación promedio de gen ErbB2/cromosoma 17 superior a 2,2 por FISH, o un número promedio de copias del gen/célula de ErbB2/6 o más se considera ErbB2-positiva en el contexto de la identificación individuos que son candidatos para terapia del

55

La divulgación proporciona además productos, por ejemplo, artículos de fabricación, que comprenden preparaciones farmacéuticas de PEPD. Los productos comprenden PEPD aislada y/o purificada. La PEPD puede ser una forma enzimáticamente activa o inactiva de PEPD. Los artículos de fabricación incluyen envases y/o material impreso. La presente divulgación incluye un paquete cerrado o sellado que contiene una preparación de PEPD. El paquete puede comprender uno o más viales cerrados o sellados, frascos, envases de blíster (burbuja), o cualquier otro envase

60

- adecuado para la venta, distribución o uso de los agentes farmacéuticos PEPD. El material impreso puede incluir información impresa. La información impresa se puede proporcionar en una etiqueta o en un prospecto de papel o puede estar impresa en el material de envasado mismo. La información impresa puede incluir información que identifique al agente de PEPD en el envase, las cantidades y tipos de otros ingredientes activos y/o inactivos, e instrucciones para tomar la composición, tal como el número de dosis a tomar en un período de tiempo determinado. y/o información dirigida a un farmacéutico y/u otro proveedor de atención médica, tal como un médico o un paciente. El kit puede comprender y la información impresa puede identificar un agente adicional, tal como un inhibidor de la coagulación, que se proporciona por separado o en combinación con el agente de PEPD. El material impreso puede incluir una indicación de que la composición farmacéutica de PEPD y/o cualquier otro agente provisto con el kit es para el tratamiento de un cáncer ErbB2-positivo. El producto se puede proporcionar como un kit que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de PEPD, envasada en un envase, el kit que comprende además una etiqueta unida o envasada con el envase, la etiqueta que describe el contenido del envase y que proporciona indicaciones y/o instrucciones sobre el uso del contenido del envase para tratar el cáncer ErbB2-positivo.
- 15 Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar pero no limitar la invención.

EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra que la PEPD humana se une al subdominio 3 en el ECD de ErbB2 humano y causa la dimerización de ErbB2.

Se generó PEPD humana recombinante en bacterias como se describe más adelante y se incubó a 0,04, 0,2 o 1 μM con 0,04 μM de ErbB2/ECD-Fc [una quimera recombinante de ECD ErbB2 humano (Thr23-Thr652) y el fragmento Fc de IgG₁ humano] o 0,04 μM de Fc como control. PEPD se unió específicamente al ECD, y cada subunidad de PEPD se unió máximamente a una copia del ECD (Figura 1a). Dado que tanto PEPD como ErbB2/ECD-Fc (debido a Fc) forman homodímeros en solución, el resultado anterior indica que un dímero PEPD se une a un dímero ECD. PEPD también se incubó a 1 μM con 0,04 μM de ErbB3/ECD-Fc [una quimera del ECD (Ser20-Thr643) de ErbB3 y Fc humano] o 0,04 μM de ErbB4/ECD-Fc [una quimera del ECD (Gln26-Arg649) de ErbB4 humano y Fc], pero no se pudo detectar la unión (Figura 1a). Como se esperaba, la neuregulina-1 (NRG-1) se unió a los ECD de ErbB3 y ErbB4 (Figura 7). Por lo tanto, PEPD no es un ligando de ErbB3 o ErbB4. Además, los autores estudiaron la unión de PEPD a ErbB2 usando células CHO-K1 de ovario de hámster chino, que expresaban un nivel bajo de ErbB2, pero ninguno de los otros ErbB (Figura 8a). La sobreexpresión de ErbB2 humano en células CHO-K1 se logró fácilmente mediante la transfección del gen (Figura 1b). En un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando lisados de células que sobreexpresan ErbB2, la PEPD se unió a ErbB2 con un valor de Kd estimado de 7,3 nM, mientras que hubo poca unión de PEPD a los lisados de las células CHO-K1 de control (Figura 1c). PEPD no se unió a las regiones de transmembrana e intracelulares de ErbB2 (Figura 8b). A continuación, se eliminaron los cuatro subdominios ECD de ErbB2 humano uno a la vez (Figura 1 d), usando el plásmido pCMV6-XL5-ERBB2 que expresa ErbB2 como molde. Se detectaron niveles similares de expresión de proteínas de ErbB2 y sus mutantes en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente con los plásmidos (Figura 1d). Se utilizó una cantidad igual de ErbB2 y sus mutantes, sobre la base de la cuantificación de la electrotransferencia, en el mismo ELISA mencionado anteriormente. La eliminación del subdominio D1 tuvo poco impacto en la unión de PEPD-ErbB2; la afinidad de unión después de eliminar los subdominios D2 y D4 se redujo 3,5 veces y 51,0 veces, respectivamente, pero la unión completa a PEPD se logró mediante la elevación de la concentración de PEPD; la eliminación del subdominio D3, anuló completamente la unión de PEPD (Figura 1e). Por lo tanto, la PEPD unida a D3, pero D2 y D4, esta última en particular, puede facilitar la unión de PEPD a ErbB2.

Se sabe que la sobreexpresión de ErbB2 en células causa dimerización espontánea. Como se esperaba, tanto los monómeros como los dímeros de ErbB2 existían en células CHO-K1 que sobreexpresan de forma estable ErbB2 (Figura 1f). Las células se trataron con el agente de reticulación bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3) antes de la recolección y el análisis de electrotransferencia. La PEPD aparentemente experimentó dos fases de unión a ErbB2: unión rápida de homodímeros de PEPD a homodímeros de ErbB2 preexistentes (sin cambio en el nivel de monómero de ErbB2, disminución en el nivel de dímero de ErbB2 y formación de heterotetrámero de 2 ErbB2 y 2 PEPD a 10 min de tratamiento con PEPD), seguido por la unión del homodímero PEPD al monómero ErbB2, que fue evidente a los 30 minutos del tratamiento con PEPD (disminución en el nivel de monómero ErbB2, formación de heterotrímero de 1 ErbB2 y 2 PEPD, formación de nuevo homodímero de ErbB2 y aumento adicional en el heterotrímero de 2 ErbB2 y 2 PEPD (Figura 1f). Notablemente, la presencia de homodímeros de ErbB2 no ligados a PEPD después del tratamiento con PEPD probablemente se debió a una reticulación incompleta de las dos proteínas por BS3.

Ejemplo 2

60

Este ejemplo demuestra que la PEPD induce la fosforilación de ErbB2 de forma lenta y transitoria, pero causa un agotamiento pronunciado y persistente de ErbB2. En las células CHO-K1/ErbB2 que sobreexpresan de forma estable ErbB2 humano y las células BT-474 de cáncer de mama humano que sobreexpresan constitutivamente ErbB2, se midieron dos sitios clave de fosforilación de tirosina en ErbB2, pY1221/1222 y pY1196. La fosforilación de tirosina de ErbB2 en ambos sitios se incrementó evidentemente después de 0,5-1 h de tratamiento con PEPD a 2,7 nM, alcanzó el pico a las 3 h, y retornó en gran medida al nivel basal a las 24 h (Figuras 2a y 2b). A las concentraciones de PEPD más altas (27 y 270 nM), la fosforilación de tirosina de ErbB2 en estos sitios aumentó adicionalmente y duró más tiempo (Figura 2c). La fosforilación de tirosina de ErbB2 relativamente lenta inducida por PEPD es compatible con la unión de PEPD relativamente lenta al monómero de ErbB2 y la subsiguiente dimerización (Figura 1f). La PEPD se une rápidamente al dímero de ErbB2 preexistente (Figura 1f), pero se sabe que tales dímeros presentan autofosforilación de tirosina. Como se esperaba, ni el factor de crecimiento epidérmico (EGF) ni NRG-1 (ligandos de otros ErbB) activaron ErbB2 en células CHO-K1/ErbB2 (Figura 9). En las células tratadas con PEPD a 2,7 nM, el nivel de proteína ErbB2 comenzó a disminuir a la 1 h, alcanzó su nivel más bajo a las 6 h, que se mantuvo durante al menos 72 h (Figura 2a), mientras que no hubo cambios en el nivel de ErbB2 en las células tratadas con vehículo (Figura 2b). El impacto de la PEPD en el nivel de proteína ErbB2 fue dependiente de la dosis y, a 270 nM, la PEPD produjo la eliminación casi total de ErbB2 (Figura 2c). Para comprender cómo PEPD produjo el agotamiento de ErbB2, se midió el ECD de ErbB2 en el medio de cultivo y ErbB2-p95 (menos ECD) en los lisados celulares después de que las células CHO-K1/ErbB2 se trataron con PEPD, ya que ErbB2 puede experimentar la liberación del ECD. Se sabe que el ácido 4-aminofenilmercuríco (APMA) causa la escisión del ECD ErbB2, y como se esperaba, generó el fragmento p95 (menos ECD) en los lisados celulares y el ECD en el medio (Figura 2d). Sin embargo, incluso cuando las células se trataron con PEPD a 270 nM durante hasta 6 h, no se produjo la liberación del ECD de ErbB2 (Figura 2d). Por lo tanto, la PEPD no causa la escisión del ECD ErbB2. Además, no hubo cambios en el nivel de ARNm de ErbB2 en las células CHO-K1/ErbB2 ni en las células BT-474 después del tratamiento con PEPD durante 6 h (Figura 2e), lo que indica que el agotamiento de ErbB2 inducido por PEPD tampoco se debió a la inhibición de la expresión del gen ERBB2. A continuación, tanto las células CHO-K1 como las células CHO-K1/ErbB2 se trataron con vehículo o PEPD, seguido de tinción por inmunofluorescencia de ErbB2 y PEPD y la detección por microscopía confocal. Las células se trataron con PEPD a una alta concentración (270 nM) para mejorar la detección. En las células CHO-K1, la tinción con ErbB2 fue despreciable y no hubo tinción con PEPD (Figura 2f), compatible con una expresión muy baja de ErbB2 en estas células. En las células CHO-K1/ErbB2, ErbB2 se tiñó fuertemente en la membrana plasmática y, después de la incubación con PEPD durante 0,25 h, también se detectó una fuerte tinción de PEPD en la membrana plasmática, que se colocó con ErbB2 (Figura 2f), compatible con la unión de PEPD a ErbB2. Sin embargo, en las células CHO-K1/ErbB2 tratadas con PEPD durante 2 h, la intensidad de la tinción de ambas proteínas en la membrana plasmática disminuyó, con un aumento concurrente de la tinción en el citoplasma (Figura 2f), lo que sugiere que ErbB2 y PEPD se internalizaron. Se demostró previamente que ErbB2 experimentó endocitosis, ubiquitinación y degradación independientes de clatrina. En efecto, cuando las células se trataron con PEPD a 2,7 nM durante 0,5 h, el nivel de ErbB2 ubiquitinado aumentó significativamente (Figura 2g).

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que la fosforilación de ErbB2 resulta de la unión directa a PEPD, pero la función dipeptidasa de PEPD no está involucrada. Se analizó si la estimulación de la fosforilación de ErbB2 por PEPD resulta de la interacción directa entre las dos proteínas. Primero, las células CHO-K1 se transfectaron con una mutante de ErbB2 muerta por quinasa (K753M) durante 24 h y luego se trataron con PEPD a 270 nM durante 3 h, una condición que demostró que causa la fosforilación máxima de ErbB2 de tipo salvaje. La mutante ErbB2 se sobreexpresó en las células después de la transfección génica, pero la PEPD no logró estimular su fosforilación, mientras que, en la misma condición experimental, la PEPD estimuló la fosforilación de ErbB2 tipo salvaje (Figura 3a). A continuación, las células CHO-K1 se transfectaron con las mutantes de ErbB2 que carecían de un subdominio ECD (Figura 1d) durante 24 h y luego se trataron con PEPD a 270 nM durante 3 h. La fosforilación de ErbB2 inducida por PEPD tanto en pY1221/1222 como en pY1196 tanto en ErbB2/delD1 y ErbB2/delD2 fue comparable a la de WT-ErbB2, ausente en ErbB2/delD3 y atenuada en ErbB2/delD4 (Figura 3a), que se correlacionó bien con la unión de PEPD a estas mutantes (Figura 1e). Estos resultados sugieren que la activación de ErbB2 por PEPD en células se debe completamente a la unión directa de PEPD a ErbB2.

Se generaron y evaluaron cuatro mutantes de la PEPD humana para comprender mejor la PEPD como un ligando de ErbB2, que incluye R184X-PEPD (supresión de 309 aminoácidos del extremo C-terminal), R265X-PEPD (supresión de 228 aminoácidos del extremo C-terminal), G278D-PEPD (G-> D en el aminoácido #278) y X265R-PEPD (supresión de 228 aminoácidos del extremo N-terminal) (Figura 10a). Las células CHO-K1 se transfectaron con ErbB2 humano de tipo salvaje durante 24 h y luego se trataron con PEPD de tipo salvaje y cada uno de sus mutantes a 270 nM durante 3 h. Las mutantes de PEPD no pudieron inducir la fosforilación de ErbB2, excepto G278D-PEPD, que era idéntica a la WT-PEPD en la activación de ErbB2 (Figura 3b). Sin embargo, G278D-PEPD es enzimáticamente inactiva

(ver, por ejemplo, Ledoux P, et al. Expression and molecular analysis of mutations in prolidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1996; 59:1035-1039.) Curiosamente, solo WT-PEPD y G278D-PEPD pudieron formar homodímeros (Figura 10b). Por lo tanto, la actividad dipeptidasa de la PEPD no está involucrada en la activación de ErbB2, pero es probable que se requiera la homodimerización de PEPD para que la PEPD se una y active a ErbB2.

5 Notablemente, en los experimentos descritos anteriormente, PEPD o su mutante G278D no causó una disminución en el nivel de proteína de ErbB2, mientras que PEPD causó un agotamiento pronunciado de ErbB2 en células que sobreexpresan ErbB2 de forma estable o constitutiva (Figuras 2a y 2c). Se halló que en las células CHO-K1 que sobreexpresan de forma transitoria ErbB2, la mayoría de las moléculas de ErbB2 residían intracelularmente, mientras
10 que en las células CHO-K1 que sobreexpresan ErbB2 de forma estable, la mayoría de las moléculas de ErbB2 se expresaron en la superficie celular (Figura 11). Esto puede explicar por qué el tratamiento con PEPD durante 3 h no causó una disminución clara de la proteína ErbB2 en las células que sobreexpresan transitoriamente ErbB2.

Ejemplo 4

15 Este ejemplo demuestra que la PEPD intracelular no modula ErbB2. PEPD es principalmente una proteína citosólica. Los niveles de PEPD endógenos en las células CHO-K1/ErbB2 y las células BT-474 fueron relativamente bajos, pero el nivel de PEPD se podría elevar fácilmente en estas células mediante la transfección génica. Se detectó una sobreexpresión moderada o fuerte de PEPD a las 24 h después de la transfección de un plásmido que expresa PEPD
20 humana, pero ni la fosforilación de tirosina de ErbB2 ni la expresión de la proteína ErbB2 cambiaron después de la sobreexpresión de PEPD (Figura 4a). Para averiguar si las células liberan PEPD, las células que sobreexpresan PEPD y las células de control se cultivaron en un medio durante 24 h, seguido de la medición del nivel de PEPD en los lisados celulares por transferencia de Western y en el medio por ELISA. Las concentraciones de PEPD en los medios de las células que sobreexpresan PEPD fueron 5,9 veces (células CHO-K1/ErbB2) y 10,3 veces (células BT-474) más
25 altas que en los medios de las células de control (Figura 4b). Debido a que todas las células parecían morfológicamente normales y saludables, el resultado anterior sugiere que las células pueden liberar activamente la PEPD. Sin embargo, debido a la aparentemente excesiva dilución por el medio de cultivo, la concentración de PEPD extracelular fue demasiado baja (<0,3 nM) para afectar a ErbB2 (Figura 4b).

30 Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que PEPD silencia rápidamente la señalización ErbB2-Src. ERK se halla corriente abajo de ErbB2. Como se esperaba, el tratamiento con PEPD (2,7 nM) llevó a la activación de ERK en un marco de tiempo que coincidió con el de la fosforilación de ErbB2 (comparar la Figura 5a con la Figura 2a), lo que sugiere una transmisión
35 de señal rápida desde ErbB2 activado a ERK. En efecto, en las células CHO-K1 que expresan la mutante K753M de ErbB2 muerta por quinasa, la PEPD no causó ni la fosforilación de ErbB2 (Figura 3a) ni la fosforilación de ERK (Figura 12). AKT también se halla corriente abajo de ErbB2, pero su fosforilación S473, que es crítica para su función, se redujo con PEPD (2,7 nM) en las células CHO-K1/ErbB2 y las células BT-474 de una manera dependiente del tiempo (Figura 5a), mientras que el tratamiento con vehículo no tuvo impacto en la fosforilación de AKT (Figura 5b). Esto
40 sugirió que PEPD moduló la señalización de ErbB2 a través de mecanismos adicionales. Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de ErbB2 causa dimerización espontánea y autofosforilación de tirosina. También se sabe que Src y PI3K se activan cuando se unen a homodímeros o heterodímeros de ErbB2 con fosforilación de tirosina, lo que lleva a la activación de AKT. En las células CHO-K1/ErbB2, ErbB2 se asoció con Src junto con CK2, un sustrato de Src y una serina/treonina proteína quinasa pleiotrópica, pero no se detectó PI3K, mientras que en las células BT-
45 474, ErbB2 se asoció con Src, CK2 y PI3K (Figura 5c). El tratamiento de estas células con PEPD (2,7 nM) durante solo 0,5 h llevó a una disociación marcada de Src y CK2 de ErbB2, pero PI3K permaneció asociada con ErbB2 (Figura 5c). Por consiguiente, la actividad de la quinasa Src se atenuó significativamente mediante PEPD tanto en las células CHO-K1/ErbB2 como en las células BT-474, mientras que la actividad de PI3K permaneció sin cambios (Figura 5d). Sin embargo, ni Src ni PI3K se modularon significativamente con PEPD en las células CHO-K1 (Figura 5d). Otros
50 experimentos demostraron que la fosforilación de Src en Y419, crítica para su función de quinasa, disminuyó significativamente tanto en las células CHO-K1/ErbB2 como en las células BT-474 después del tratamiento con PEPD (2,7 nM) durante solo 10 minutos (Figura 5e), lo que indica una unión de PEPD rápida a los dímeros de ErbB2 y rápida alteración de la unidad de señalización de ErbB2-Src. Debido a que el impacto de la PEPD en la Src se produjo antes de un cambio claro en la fosforilación y expresión de ErbB2, particularmente en las células CHO-K1/ErbB2 (Figura
55 2a), la PEPD probablemente alteró la conformación de los dímeros de ErbB2 preexistentes, lo que causa la disociación de SrcB2 de ErbB2.

La supresión de Src y CK2 inducida por PEPD estuvo acompañada por la pérdida de la fosforilación de PTEN en S380 (Figura 5a), en comparación con los controles tratados con vehículo (Figura 5b). Se sabe que la fosforilación de PTEN
60 en este sitio por CK2 contribuye a la inhibición de la actividad de PTEN. También se sabe que la PTEN desfosforila

PIP3 unido a la membrana, de este modo inhibe la fosforilación de AKT y que Src también evita la translocación de la PTEN a la membrana plasmática al fosforilar directamente la PTEN en los residuos de tirosina. En efecto, la PEPD (2,7 nM, 0,5 h) inhibió la fosforilación de la tirosina de PTEN en las células CHO-K1/ErbB2 y las células BT-474 (Figura 5f), y la translocación de PTEN del citoplasma a la membrana plasmática aumentó después del tratamiento con PEPD (2,7 nM, 1 h) (Figura 5g).

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra que PEPD se dirige a las células que sobreexpresan ErbB2. Los hallazgos de los autores de la unión de PEPD a ErbB2 y los cambios subsiguientes se resumen en la Figura 6a. La rápida inhibición de la Src, que desempeña un papel importante en la oncogénesis de ErbB2 junto con un fuerte agotamiento de ErbB2, sugirió que la PEPD podría inhibir las células que sobreexpresan ErbB2. Los potenciales efectos inhibidores de la PEPD en las células CHO-K1, células CHO-K1/ErbB2 y células BT-474 se evaluaron utilizando tres ensayos como se describe a continuación.

El efecto de la PEPD en la síntesis de ADN se midió mediante la incorporación de BrdU por citometría de flujo. Las células se trataron con PEPD a 2,7 y 27 nM durante 48 h. Si bien la PEPD no fue efectiva en las células CHO-K1, redujo el número de células CHO-K1/ErbB2 positivas para BrdU y las células BT-474 en hasta un 65% y 50%, respectivamente (Figura 6b). Para medir el efecto de la PEPD en el crecimiento independiente del anclaje, las células se cultivaron en agar blando y se trataron con PEPD a 2,7 y 27 nM durante 21 días con un cambio de medio cada 3-4 días. La formación de colonias no fue afectada significativamente por la PEPD en las células CHO-K1, pero fue inhibida marcadamente por la PEPD tanto en las células CHO-K1/ErbB2 como en las células BT-474. PEPD redujo el número de colonias con un diámetro de $\geq 100 \mu\text{M}$ en células CHO-K1/ErbB2 y células BT-474 hasta en un 50% y 57%, respectivamente (Figura 6c). El efecto de la PEPD en la invasión y migración celular se midió utilizando las cámaras de BioCoat Matrigel Invasion. Las células se cultivaron en la cámara superior y se trataron con solvente o PEPD a 2,7 y 27 nM durante 48 h, y se contaron las células que invadieron a través de la membrana de Matrigel en la parte inferior de la cámara superior. La PEPD no fue efectiva en CHO-K1, pero inhibió la invasión y migración de las células CHO-K1/ErbB2 y las células BT-474 en hasta un 50% y un 51%, respectivamente (Figura 6d). En conjunto, estos resultados confirman que el impacto de la PEPD sobre ErbB2 es predominantemente inhibitorio y también muestran que la PEPD se dirige selectivamente a las células que sobreexpresan ErbB2.

Será evidente a partir de los datos anteriores que la presente divulgación rompe el largo período en el que ErbB2 se considera un receptor huérfano. En comparación con otros ligandos de receptores ErbB, son notables varias características inusuales de la PEPD humana: no tiene un motivo EGF; aparentemente se une a ErbB2 como un homodímero; y suprime la señalización oncogénica de ErbB2. PEPD se une tanto al monómero de ErbB2 como al dímero de ErbB2, pero como se muestra en la Figura 1f, PEPD se une a los homodímeros de ErbB2 más rápidamente que a los monómeros de ErbB2. Esto explica por qué la PEPD causa una variabilidad rápida de la señalización de ErbB2-Src (Figura 5), pero un poco más lenta de la fosforilación de ErbB2 (Figura 2a).

Cuando se evaluó su efecto sobre el crecimiento y la proliferación celular, la PEPD no fue efectiva en las células CHO-K1 que expresaban un bajo nivel de ErbB2, pero mostraron fuertes actividades inhibitorias en las células CHO-K1 que sobreexpresan ErbB2 (células CHO-K1/ErbB2) y las células BT-474, que incluyen la inhibición de la síntesis de ADN, el crecimiento independiente del anclaje y la invasión y migración (Figuras 6b-6d). Esto demuestra que la PEPD se dirige a la adición al oncogén ErbB2, ya que las células CHO-K1/ErbB2 se derivaron de las células CHO-K1; al menos dos mecanismos pueden estar involucrados: la PEPD causa el agotamiento de ErbB2 al inducir la internalización y degradación de ErbB2, y la PEPD inhibe la señalización de ErbB2-Src al interrumpir su asociación (Figura 5). Los efectos de la PEPD en ErbB2 se parecen a los del trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido a ErbB2 que se une al subdominio 4 de ECD ErbB2 y se usa actualmente para tratar los cánceres de mama ErbB2-positivos. Los datos presentados en los ejemplos anteriores muestran que a concentraciones equimolares, la inhibición de la proliferación de las células CHO-K1/ErbB2 y células BT-474 por parte de PEPD o su mutante G278D fue similar a, si no mejor que la de trastuzumab, mientras que ninguno de los agentes mostró actividad inhibitoria en las células CHO-K1 (Figura 14). La PEPD humana recombinante o su mutante, producida en bacterias, potencialmente puede ser una alternativa de bajo costo al trastuzumab altamente costoso que se debe producirse en células de mamíferos. Además, como se mencionó anteriormente, in vivo, el trastuzumab no regula por disminución la expresión de ErbB2 ni inhibe la fosforilación de la tirosina de ErbB2 en los tejidos cancerosos; más bien, su actividad antitumoral depende principalmente de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) a través de su dominio Fc. Por lo tanto, la PEPD o su mutante se pueden sinergizar con trastuzumab o superar en cierta medida la resistencia a trastuzumab de los pacientes. La PEPD no se une a ErbB3 y ErbB4 (Figura 1a), pero es bien sabido que ErbB2 es un compañero de heterodimerización preferido con estos ErbB. Esto plantea la cuestión de si el bloqueo de la señalización oncogénica de ErbB2 por PEPD también puede incluir la inhibición de las unidades de señalización del heterodímero

de ErbB2. De forma notable, en el cáncer de mama humano, la actividad oncogénica de ErbB2 depende fundamentalmente de ErbB3. Será evidente para los expertos en la técnica que la presente divulgación revela fundamentalmente una función nueva de la PEPD humana: un ligando de ErbB2 independiente de su actividad dipeptidasa. Las PEPD de muchas especies comparten una alta homología de secuencia con la PEPD humana y también se pueden unir y modular a ErbB2.

En vista de los resultados in vitro descritos en los ejemplos 1-6, que apoyan firmemente el uso de PEPD como agente para tratar los cánceres positivos para Erb2, se analizaron PEPD y la versión enzimáticamente inactiva in vivo para determinar su eficacia contra los cánceres ErbB2-positivos en modelos animales clínicamente relevantes, como se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra el uso de PEPD humana recombinante y su PEPD^{G278D} mutante in vivo como agente anticancerígeno. Como fue el caso en los experimentos in vitro mostrados en los ejemplos 1-6, los datos presentados en este ejemplo se obtuvieron usando PEPD humana recombinante y su PEPD^{G278D} mutante con 6xH marcada en el extremo terminal carboxi que se generó en *E. coli* y se purificó por cromatografía de afinidad usando una marca HIS manipulada genéticamente en estas proteínas. Estos productos se utilizaron en los siguientes experimentos.

Primero, se realizaron experimentos para buscar la dosis. In vitro, la PEPD a concentraciones tan bajas como 2,7 nM fue efectiva contra las células que sobreexpresan ErbB2. A los ratones C57BL/6 se les administró una dosis intraperitoneal única de PEPD, y los ratones se sacrificaron para la recolección de sangre a las 1,6 o 24 h después de la dosificación. Mientras se administra PEPD a 10 mg/kg la PEPD plasmática se elevó a 16,5 nM a 1 h y 13,6 nM a las 24 h pos-dosis, en comparación con 0,9 nM en los ratones de control, la administración de PEPD a 0,2 mg/kg produjo inesperadamente una disminución de 51-61% en el nivel de PEPD en plasma (Figura 14a). Sin embargo, se descubrió que la combinación de los agentes de PEPD con la enoxaparina (EP), que es una heparina de peso molecular bajo usada clínicamente y se sabe que inhibe el factor Xa y otros factores de coagulación, produce la persistencia de la PEPD, ya que el nivel plasmático de PEPD después de la administración de PEPD a 0,2 mg/kg fue hasta 64 veces mayor en ratones tratados previamente con EP que en ratones sin tratamiento con EP (Figura 14b). Sin pretender estar restringido por ninguna teoría particular, se considera que la EP puede estar reduciendo la degradación de la PEPD. Es plausible que otros inhibidores de la coagulación también sean efectivos para mantener la concentración plasmática de PEPD in vivo. A continuación, se analizó si la PEPD inhibe el crecimiento de los tumores que sobreexpresan ErbB2 in vivo. Las células CHO-K1/ErbB2, que sobreexpresan de forma estable ErbB2 humana, pero expresan cualquier otro receptor de la familia ErbB, se inocularon por vía subcutánea en los flancos de ratones atímicos hembras (6-7 semanas de edad) a 1×10^6 células por sitio en volumen pequeño de mezcla de PBS:Matrigel. A partir de 4 días después de la inoculación celular, los ratones recibieron un vehículo o EP a 2,5 mg/kg por inyección intraperitoneal una vez por día. Tres días después de comenzar el tratamiento con EP (el día 7 después de la inoculación celular), cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 41 mm³, los ratones tratados con EP también se trataron con vehículo o PEPD a 0,02 mg/kg o 0,2 mg/kg por inyección intraperitoneal, que se administró tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes). De forma notable, en los días en que se administraron EP y vehículo/PEPD, el vehículo o PEPD siempre se administró 1 h después de la dosificación de EP. El volumen del tumor se midió tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) por largo \times ancho²/2. Los ratones se sacrificaron 24 h después del último tratamiento que se administró el día 24 después de la inoculación celular (un total de 8 tratamientos con PEPD), y se recogieron muestras de sangre de los ratones para medir los niveles plasmáticos de PEPD mediante ELISA. Si bien la EP no tuvo efecto sobre el crecimiento del tumor, EP más PEPD a 0,02 y 0,2 mg/kg inhibió el crecimiento del tumor en 27% (estadísticamente insignificante) y un 65% (estadísticamente muy significativo), respectivamente (Figura 15a). Los niveles plasmáticos de PEPD total (PEPD de ratón endógena más PEPD humana) al final del experimento fueron de 1,9 nM en el grupo de EP solo, 5,5 nM en el grupo de EP más PEPD de dosis más baja y 33,0 nM en el grupo de EP más PEPD de dosis alta, que son 1,4-, 4,2-, 24,8 veces más que en los ratones de control (Figura 15b).

A continuación, se analizó si PEPD se dirige específicamente a los tumores que sobreexpresan ErbB2 in vivo. Las células CHO-K1 que expresan ErbB2 despreciable y que no expresan otros ErbBs se inocularon por vía subcutánea en los flancos de ratones desnudos atímicos hembra (6-7 semanas de edad) a 1×10^6 células por sitio en un volumen pequeño de mezcla de PBS:Matrigel. A partir de 4 días después de la inoculación celular, los ratones se trataron con EP a 2,5 mg/kg por inyección intraperitoneal una vez por día. Tres días después (el día 7 después de la inoculación celular), cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 26 mm³, los ratones también se trataron con vehículo o PEPD a 0,2 mg/kg por inyección intraperitoneal, que se administró tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). En los días en que se administraron EP y PEPD/vehículo, PEPD/vehículo siempre se administró 1 h después de la administración de EP. El volumen del tumor se midió tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Los

ratones se sacrificaron 24 h después del último tratamiento que se administró el día 21 después de la inoculación celular (un total de 7 tratamientos con PEPD), y se recogieron muestras de sangre de los ratones para medir el nivel plasmático de PEPD. El tratamiento con PEPD no tuvo efecto sobre el crecimiento del tumor (Figura 16a), aunque los niveles plasmáticos se elevaron como se esperaba (Figura 16b). Por lo tanto, nuestros datos presentados en la presente demuestran que la PEPD se dirige específicamente a tumores que comprenden células que sobreexpresan ErbB2.

A continuación, se evaluó el efecto de la PEPD en un modelo de tumor de mama ortotópico. Las células BT-474 del cáncer de mama humano sobreexpresan constitutivamente ErbB2 y se han utilizado ampliamente para generar tumores de mama ortotópicos para la evaluación de terapias anti-ErbB2. Se implantaron subcutáneamente ratones desnudos atímicos hembra (6-7 semanas de edad) con una liberación de 60 días de pellet de 17β -estradiol (1,7 mg de estradiol, adquirido en Innovative Research of American) antes de la inoculación ortotópica de células BT-474 en las almohadillas de grasa mamarias (2×10^6 células por sitio en un volumen pequeño de mezcla de PBS:Matrigel). Veintitrés días después de la inoculación de las células cancerosas, todos los ratones comenzaron el tratamiento diario de EP a 0,5 mg/kg diarios mediante inyección intraperitoneal. De forma notable, un experimento de búsqueda de dosis mostró que la EP a 0,5 mg/kg fue tan efectiva como 2,5 mg/kg en el mantenimiento de la concentración de PEPD en la sangre. Además, otro grupo de ratones a los que se implantó 17β -estradiol y luego se inocularon con células BT-474 se mantuvieron como un control sin tratamiento, para confirmar que la PE misma no tenía ningún efecto sobre el crecimiento del tumor. Los ratones sin tratamiento se mantuvieron durante 58 días después de la inoculación de células cancerosas (Figura 17a). Los ratones tratados con EP se aleatorizaron en tres grupos para recibir el vehículo, PEPD y PEPD^{G278D}, mientras que el tratamiento diario con EP continuó. Sobre la base de su experiencia con PEPD en el modelo de tumor CHO-K1/ErbB2, los autores decidieron tratar a los ratones con PEPD o su mutante a 2 mg/kg. El tratamiento con vehículo, PEPD o su mutante se inició 4 días después del comienzo del tratamiento con EP (el día 27 después de la inoculación de las células cancerosas), y cada uno se administró mediante inyección intraperitoneal tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes). Cuando la EP también se administró el mismo día, siempre se administró 1 h antes que el otro agente. El volumen del tumor se midió los lunes, miércoles y viernes cada semana. Como se muestra en la Figura 17a, el EP no tuvo efecto sobre el crecimiento del tumor, pero tanto la PEPD como la PEPD^{G278D} causaron rápidamente la contracción del tumor. PEPD^{G278D} fue más efectiva que PEPD (la diferencia en el volumen del tumor entre los dos grupos es estadísticamente significativa). En vista de la fuerte eficacia antitumoral de los agentes, todos los tratamientos se detuvieron un mes después (la última dosis se administró el día 58 después de la inoculación de las células cancerosas) y los ratones se mantuvieron en observación. También se obtuvo un pequeño volumen de sangre de los ratones 24 h después de la última dosis para medir el nivel de PEPD en plasma. El nivel de PEPD plasmático en ratones tratados con EP solo fue 1,9 nM, 1,4 veces más alto que en ratones sin tratamiento (Figura 17b), lo que demuestra nuevamente que la EP facilita significativamente la persistencia de PEPD de ratón endógena. Además, los niveles plasmáticos de PEPD en los ratones tratados con EP más PEPD y EP más PEPD^{G278D} fueron 154,3 nM y 128,6 nM, respectivamente, que son 111,0 y 92,5 veces más altos que en los ratones sin tratamiento (Figura 10b). Se implantó un segundo pellet de 17β -estradiol a cada ratón el día 59 después de la inoculación de las células cancerosas. Tres semanas después de la detención del tratamiento (en el día 80 después de la inoculación del cáncer), los tumores en algunos ratones que se trataron previamente con PEPD o su mutación volvieron a crecer. Sin embargo, el 50% de los ratones tratados con PEPD^{G278D} permanecieron libres de tumores y el 27% de los ratones tratados con PEPD permanecieron libres de tumores (Figura 17a), otra indicación de que PEPD^{G278D} es más efectivo que PEPD. Todos los ratones con recrecimiento tumoral se volvieron a tratar con EP más PEPD^{G278D}: la EP diaria a 0,5 mg/kg por inyección intraperitoneal se inició el día 89 después de la inoculación de las células cancerosas, y se administró PEPD^{G278D} a 2 mg/kg por inyección intraperitoneal cada dos días por un total de 4 dosis. Como se describió anteriormente, los días en que se administraron EP y PEPD^{G278D}, EP se administró 1 h antes. El experimento se terminó 24 h después de la última dosis de PEPD^{G278D}. Como se muestra en la Figura 17a, todos los tumores todavía eran exquisitamente sensibles a PEPD^{G278D}, lo que indica que el recrecimiento tumoral no se debió a la presencia de células cancerosas que eran resistentes a PEPD o PEPD^{G278D}, sino que se debió a una erradicación inicial incompleta de las células cancerosas. Además, los ratones tratados previamente con EP solo se volvieron a tratar con EP a 0,5 mg/kg una vez por día, lo que comenzó el día 82 después de la inoculación de las células cancerosas, y 4 días después, los ratones se dividieron en dos grupos: tratamiento con vehículo o tratamiento con PEPD^{G278D} a 2 mg/kg, se trataron tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes) mediante inyección intraperitoneal por un total de 5 dosis. El experimento finalizó 24 h después de la última dosis. Como se muestra en la Figura 17a, la PEPD^{G278D} causó una rápida contracción del volumen del tumor, aun cuando los tumores eran extremadamente grandes al comienzo del tratamiento. También es importante tener en cuenta que la significativa eficacia antitumoral de la PEPD y la PEPD^{G278D} no se asoció con ninguna toxicidad: ningún efecto sobre el aumento de peso corporal del ratón o el peso de los órganos tales como colon, corazón, riñón, hígado, pulmón y estómago. Esto indica que los agentes a las dosis terapéuticamente efectivas no son tóxicos.

60 Ejemplo 8

Este ejemplo proporciona una demostración de preparación de una proteína (fusión) híbrida PEPD-Fc.

El Trastuzumab, que se une al subdominio 4 en el dominio extracelular de ErbB2, es el agente anti-ErbB2 más exitoso y más ampliamente usado en el cáncer de mama. Sin embargo, la tasa de respuesta global al trastuzumab aún es modesta, y la resistencia primaria y secundaria sigue siendo un desafío clínico. El dominio Fc del trastuzumab es crítico por su actividad antitumoral mediante el acoplamiento de los receptores Fc en las células efectoras inmunes y la provocación de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo. En efecto, un estudio clínico encontró que el trastuzumab a los niveles de dosis utilizados para tratar los cánceres de mama ErbB2-positivos no tenía capacidad para regular por disminución las proteínas de ErbB2 en los tejidos cancerosos (Gennari R, et al. *Clinical Cancer Research* 2004, 10(17): 5650-5655). También se sabe que Fc promueve la persistencia de anticuerpos en la sangre. Sin embargo, PEPD no tiene un dominio Fc.

Se realizaron pruebas con el objetivo de realizar y determinar si la adición de Fc a PEPD para potenciar su actividad antitumoral sería plausible. La molécula híbrida PEPD-Fc también se puede retener en la sangre a un nivel más alto y durante un tiempo más prolongado que la PEPD. Se ha generado PEPD-Fc (peso molecular del monómero: 80,9 kD). Brevemente, la secuencia codificadora completa de la PEPD humana se subclonó en el vector pFUSE-hIgG1-Fc (InvivoGen), unida en el marco en su extremo C-terminal a la secuencia Fc de la IgG1 humana. El constructo resultante (pFUSE-PEPD-Fc) se verificó mediante secuenciación y se transfeció a células CHO-K1, y la proteína híbrida expresada en los lisados celulares se purificó usando proteína A-Sefarosa. La alta pureza de PEPD-Fc se confirmó mediante SDS-PAGE. La bioactividad de PEPD-Fc se comparó con la de PEPD. Las células CHO-K1/ErbB2 se trataron con vehículo, PEPD-Fc o PEPD (ambas a 27 nM) durante 3 horas o 6 horas. La PEPD-Fc causó un agotamiento de la proteína ErbB2 dependiente del tiempo y significativo, pero fue algo menos efectiva que la PEPD (Figura 18). Es posible que PEPD-Fc simplemente sea un poco más lenta que la PEPD para causar el agotamiento de ErbB2, y el aumento del tiempo de tratamiento puede permitir que la PEPD-Fc logre el mismo impacto en ErbB2 que la PEPD. Sin embargo, como se muestra en la Figura 18, los dos agentes mostraron un impacto muy similar en la fosforilación de ErbB2 y en la fosforilación de ERK, y en el silenciamiento de la señalización de ErbB2-Src (disminución de la fosforilación de Src, PTEN y AKT). Los resultados indican que PEPD-Fc en gran parte, si no totalmente, retiene la actividad moduladora de ErbB2 de PEPD. Debido a que se espera que PEPD-Fc se acople con las células inmunes in vivo, puede ser significativamente más potente que PEPD o PEPD^{G278D} para combatir los cánceres ErbB2-positivos.

Dado el beneficio de la presente divulgación, PEPD-Fc híbrido y PEPD^{G278D}-Fc se pueden evaluar fácilmente en modelos animales. Estos híbridos se pueden generar en células de mamíferos (por ejemplo, células CHO-K1) para asegurar la glicosilación en N297 de Fc, que es esencial para la función de Fc. Curiosamente, la Fc aglicosilada con ciertas mutaciones mantiene su bioactividad, que incluye, pero sin limitación Fc^{T299A} y Fc^{E382V/M428I}. Por lo tanto, se pueden generar híbridos adicionales con mutaciones específicas en la secuencia de Fc, tal como en *E. coli* y evaluar utilizando técnicas convencionales, dado el beneficio de la presente invención.

40 Ejemplo 9

Como se puede ver en la Figura 17a, y en las Figuras 19 (a)-(e) que resumen los datos obtenidos mediante la medición de los cambios in vivo en tumores tratados con rhPEPD o rhPEPD^{G278D}, rhPEPD^{G278D} es superior a rhPEPD con respecto a la reducción del volumen tumoral in vivo (Figura 17a y Figura 19(a)). Sin pretender estar limitados por ninguna teoría en particular, los autores consideran que esto está relacionado con el descubrimiento novedoso de que rhPEPD^{G278D} no estimula la señalización de HIF-1 α , mientras que PEPD sí (Figura 19(e)). A este respecto, es bien sabido en la técnica que VEGF y GLUT-1 son blancos corriente debajo de HIF-1 α , y los diferentes efectos sobre estos marcadores son similares al efecto sobre HIF-1 α . Los tres son factores de prosupervivencia bien conocidos. Sin embargo, también se observó que tanto PEPD como PEPD^{G278D} eliminaron la señalización de ErbB2, lo que inactiva ErbB3, así como activa la apoptosis en los tejidos tumorales. Ambos agentes causaron agotamiento de ErbB-2, desfosforilación de ErbB2 (inactivación), desfosforilación (inactivación) de SRC, AKT, ERK, ErbB3, regulación por disminución de Bcl-2 antiapoptótico, BAX proapoptótico y activación de múltiples caspasas en los tejidos tumorales (Figura 19b). Ambos agentes también redujeron la actividad quinasa SRC y la actividad PI3K en los tejidos tumorales (Figura 19c). También se haló que tanto la PEPD como la PEPD^{G278D} se internalizaron en las células tumorales en un grado similar, según lo medido por su marca His (Figura 19e). Este hallazgo respalda el concepto de que la PEPD o PEPD^{G278D} se puede conjugar con una toxina o un agente quimioterapéutico del cáncer, como se explicó anteriormente, para mejorar la eficacia contra el cáncer.

Es notable que in vivo, trastuzumab/herceptina no regula por disminución la expresión de ErbB2 ni inhibe la fosforilación de la tirosina de ErbB2 en tejidos cancerosos (Gennari et al., *Clinical Cancer Research*, 10, 5650-5655,

2004; Gijzen et al., PLoS Biology, 8, e1000563, 2010). Más bien, la herceptina se basa principalmente en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). Por lo tanto, sobre la base de los datos presentados en este documento, es plausible que rhPEPD^{G278D} pueda complementar la herceptina o superar cierta resistencia a la herceptina.

5

Ejemplo 10

Este ejemplo proporciona una descripción de los materiales y métodos que se utilizaron para obtener los datos descritos en los ejemplos 1-9.

10

Reactivos. Quimeras recombinantes, que incluyen ErbB2/ECD-Fc humano (1129-ER-050), ErbB3/ECD-Fc humano (348-RB-050) y ErbB4/ECD-Fc humano (1131-ER-050) así como Fc recombinante de IgG₁ humana (110-HG-100) provinieron de R&D systems. El EGF humano recombinante (236-EG-200) y el NRG-1 humano (5218) se adquirieron en R&D Systems y Cell Signaling, respectivamente. Trastuzumab (Genentech) se obtuvo de Roswell Park Cancer Institute Pharmacy. El ácido 4-aaminofenilmercúrico (APMA), cristal violeta, bromuro de metiltiazolidifenil-tetrazolio (MTT) y vanadato provinieron de Sigma-Aldrich. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-PEPD (Abeam, ab86507), anti-PTEN (Santa Cruz, sc-7974), anti-p-PTEN (Santa Cruz, sc-101789), anti-p-Tyr (PY99) (Santa Cruz, sc-7020), anti-CK2 α (Santa Cruz, sc-12738), anti-ECD of ErbB2 (Santa Cruz, sc-134481), anti-ErbB3 (Santa Cruz, sc-285), anti-TGF α (Santa Cruz, sc-9043), anti-ErbB2 (Cell Signaling, 2165), anti-p-ErbB2 (Y1196) (Cell Signaling, 6942), anti-p-ErbB2 (Y1221/1222) (Cell Signaling, 2243), anti-ErbB1 (Cell Signaling, 2232), anti-ErbB4 (Cell Signaling, 4795), anti-PI3K p85 (Cell Signaling, 4257), anti-p-Src (Cell Signaling, 6943), anti-Src (Cell Signaling, 2123), anti-AKT (Cell Signaling, 4691), anti-p-AKT (Cell Signaling, 4060), anti-ERK (Cell Signaling, 9102), anti-p-ERK (Cell Signaling, 9101), anti-ubiquitina (Santa Cruz, sc-8017), anti-GAPDH (Millipore, MAB374), anti-human IgG₁ for detection of Fc (Santa Cruz, sc-2453), anti-marca His conjugada con FITC (Abeam, ab1206), anti-marca His conjugada con biotina (Bethyl, A190-113B), y anti-cpnejo de cabra conjugado con TRITC (Jackson, 111-025-003). La estreptavidina conjugada con HRP (N100) provino de Thermo Scientific.

La PEPD humana recombinante y sus mutantes (6xHis marcada en el extremo carboxi-terminal) se generaron en bacterias y se purificaron utilizando cromatografía de afinidad de níquel (Qiagen). La pureza de cada proteína se confirmó mediante electroforesis en gel y tinción con plata (Figura 10b). Los detalles para la preparación de PEPD y sus mutantes, así como otros reactivos, se proporcionan a continuación.

El sistema de expresión bacteriano pBAD/TOPO ThioFusion (Invitrogen) se utilizó para producir y purificar PEPD y las mutantes de PEPD. En resumen, se usó pCMV6-XL5-PEPD (Origene) como molde para amplificar la PEPD humana de longitud completa mediante PCR usando cebadores para 5'-AATACGACTCACTATAGGGCG-3' (SEQ ID NO: 2) y Rev-5'-CTTGGGGCCAGAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 3), que se diseñaron para expresar PEPD como una proteína nativa con 6xHis marcada en el extremo carboxi-terminal (pero sin el Tio N-terminal). Los fragmentos de PCR resultantes se subclonaron en el vector de expresión pBAD/Tio-TOPO mediante clonación de TA. El constructo se secuenció para asegurar la integridad de la secuencia codificadora entera. La expresión y la purificación se realizaron según lo indicado por el fabricante. La mutante PEPD G278D, así como otros mutantes, que incluyen el fragmento de 184 aminoácidos N-terminal, el fragmento de 265 aminoácidos N-terminal y el fragmento de 265 aminoácidos C-terminal, se generaron por mutagénesis dirigida al sitio usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning Multi (Agilent Technologies) y usando el vector de expresión PEPD descrito anteriormente como molde. Los constructos se secuenciaron para asegurar la mutación correcta. Tanto la PEPD de tipo salvaje como la PEPD mutante se purificaron mediante cromatografía de agarosa Ni-NTA (Qiagen). Las proteínas se purificaron adicionalmente usando Ultracel YM-30 Centricon (Millipore). La SDS-PAGE se realizó en geles de acrilamida 8-10% en condiciones desnaturizantes y reductoras, y los geles se tiñeron con tinción con plata para examinar la pureza de la proteína. Las preparaciones también se verificaron para determinar la posible contaminación con lipopolisacáridos, usando el kit E-TOXATE (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante, pero no se detectaron lipopolisacáridos (límite de detección: 0,005 unidades de endotoxinas por 0,1 ml de muestra).

Líneas celulares y cultivo celular. Las células BT-474 y las células CHO-K1 eran de ATCC. Las células CHO-K1/ErbB2 se generaron por transfección de células CHO-K1 con pcDNA3-ERBB2 y se seleccionaron bajo G418. Se cultivaron células CHO-K1 y células CHO-K1/ErbB2 en medio F-12K (Gibco) suplementado con FBS 10% (Gibco). Las células BT-474 se cultivaron en DMEM rico en glucosa 50% (Mediatech)/50% de medio F-12K suplementado con FBS 10%. En el estudio también se utilizaron células MCF-7 de cáncer de mama humano y células RT-4 de cáncer de vejiga humanas, de ATCC. Las células MCF-7 y las células RT-4 se cultivaron en DMEM rico en glucosa más FBS 10% y medio de McCoy'5A más FBS 10%, respectivamente. Todas las células se cultivaron en incubadoras humidificadas a 37 °C con CO₂ 5%.

60

Transfección génica y plásmidos. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos y se transfectaron con un plásmido usando FuGENE HD (Promega) o Lipofectamine 2000 (Invitrogen). pCMV6-XL5-PEPD que expresa PEPD humana de tipo salvaje era de Origene. Se utilizó pMT107-His-Ub para expresar la ubiquitina. pCMV6-XL5-ERBB2 que expresa ErbB2 humano se generó mediante la clonación de la secuencia codificadora de ERBB2 humano de longitud completa en el vector de expresión de mamíferos pCMV6-XL5 (Origene). Para construir pCMV6-XL5-ERBB2 que expresa ErbB2 humano, la secuencia codificadora de ERBB2 humano de longitud completa se amplificó por PCR a partir del ADNc de LNCaP usando el cebador directo NotI (5'-ATAAGAATGCGGCCGAGCTGAGATTCCCCTCCATT-3') (SEQ ID NO: 4) y cebador inverso NotI (5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTTGATGCCAGCAGAAGTCA-3') (SEQ ID NO: 5). Los productos de la PCR amplificados se digirieron con NotI (New England BioLabs), seguido del ligamiento en pCMV6-XL5 (Origene) que se predigirió con la misma enzima de restricción. La orientación del inserto se determinó mediante PCR de colonias usando el cebador directo 5'-CAAATGGGCGGTAGGCGTGTA-3' (SEQ ID NO: 6) (localizado en el plásmido) y el cebador inverso 5'-ATTGGTGGGCAGGTAGGGGTTTC-3' (SEQ ID NO: 7) (apareado en el inicio del inserto). El constructo se secuenció para confirmar la integridad de la secuencia codificadora entera. Todas las mutaciones y supresiones dirigidas al sitio en el gen ERBB2 se realizaron en pCMV6-XL5-ERBB2, utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio de rayos QuikChange Lightning. Estos constructos incluyen ErbB2 que lleva la mutación K753M (pCMV6-XL5-ERBB2/K753M), supresión del subdominio 1 de ECD de ErbB2 (pCMV6-XL5-ERBB2/delD1, supresión de los aminoácidos 1-195), supresión del subdominio 2 de ECD ErbB2 (pCMV6-XL5-ERBB2/delD2, supresión de los aminoácidos 196-320), supresión del subdominio 3 de ECD ErbB2 (pCMV6-XL5-ERBB2/delD3, supresión de los aminoácidos 321-488) y supresión del subdominio 4 de ECD ErbB2 (pCMV6-XL5-ERBB2/delD4, supresión de los aminoácidos 489-560). Todos los constructos se secuenciaron para asegurar la mutación/supresión correcta.

Análisis de electrotransferencia. La preparación de los lisados celulares, la medición de la concentración de proteínas y la electrotransferencia se realizaron utilizando técnicas estándares. La membrana celular, las fracciones de citosol o los lisados celulares menos la membrana celular se prepararon utilizando el kit de reactivo de extracción de proteína de membrana eucariótica Mem-PER (Thermo Scientific). El medio de cultivo celular se concentró 20 veces utilizando Centricon (Millipore) antes del análisis. En experimentos que miden la unión de PEPD o NRG-1 a ECD ErbB2, ECD ErbB3 o ECD ErbB4 se usó un kit de tinción con plata (Invitrogen) para mostrar las proteínas después de la electroforesis en gel. Para detectar la dimerización del receptor ErbB2, las células tratadas con PEPD y las células de control se lavaron con PBS enfriado con hielo y se incubaron con el agente de reticulación BS3 (Pierce) a 2 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción de reticulación se terminó mediante la adición de Tris 50 mM (final, pH 7,5), seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los lisados celulares se analizaron mediante electrotransferencia (SDS-PAGE 3,5%). Se usó electroforesis en gel no reductor para determinar, además de la PEPD humana de tipo salvaje, si alguna de sus mutantes, que incluyen G278D-PEPD, R184X-PEPD, R265X-PEPD y X265R-PEPD, existía como homodímero. Brevemente, cada muestra de proteína se mezcló con un tampón de muestra no reductor (tampón de carga de muestra sin p-mercaptoetanol) y luego se resolvió mediante SDS-PAGE 10%, antes de la tinción con plata. Las concentraciones de proteína de todas las muestras se midieron con el kit de ensayo de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce).

Inmunoprecipitación. La PEPD se incubó con ErbB2/ECD-Fc, ErbB3/ECD-Fc, ErbB4/ECD-Fc o Fc en un tampón de unión durante 2 horas a 37 °C, seguido de extracción con perlas de proteína G-sefarosa. Los inmunoprecipitados se lavaron con tampón de lavado de IP y se analizaron mediante electrotransferencia. Para la detección de la unión directa y específica de PEPD o NRG-1 a ErbB2, ErbB3 o ErbB4, se incubó PEPD humana recombinante o NRG-1 con ErbB2/ECD-Fc humana recombinante, ErbB3/ECD-Fc humana recombinante, ErbB4 humana recombinante/ECD-Fc o Fc humana recombinante en 0,4 ml de tampón de unión. Todas las soluciones se incubaron durante 2 horas a 37 °C, seguido de incubación con perlas de proteína G-sefarosa durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inmunoprecipitados se lavaron con tampón de lavado de IP y luego se sometieron a un análisis de electrotransferencia. En experimentos con lisados de células enteras, las células se lisaron en un tampón de M-PER suplementado con una mezcla de inhibidores de proteínasa (Roche Applied Science), y los lisados se incubaron con un anticuerpo específico durante la noche a 4 °C, seguido de extracción por la proteína G-agarosa. Los inmunoprecipitados se lavaron con tampón de lavado IP y se analizaron mediante electrotransferencia. Para medir el efecto de la PEPD sobre la fosforilación de tirosina de PTEN, las células se pretrataron con pervanadato 30 µM durante 10 minutos para inhibir la tirosina fosfatasa relevante y luego se trataron con PEPD o vehículo, seguido de la preparación de lisados celulares para su análisis. Se preparó pervanadato fresco incubando vanadato 10 mM con peróxido de hidrógeno 10 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de catalasa (Sigma) a una concentración final de 0,2 mg/ml para eliminar el peróxido de hidrógeno residual.

Medición basada en ELISA de PEPD y unión de PEPD a ErbB2. Para medir la unión de PEPD a ErbB2 humano o sus mutantes de supresión, las placas de ELISA se recubrieron durante la noche a 4 °C con 100 µl/pocillo de un anticuerpo ErbB2 (unión a la cola citoplásmica de ErbB2) a 10 µg/ml. Después de lavar los pocillos tres veces con

PBST, los sitios de unión a proteínas residuales en los pocillos se bloquearon mediante incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con 300 µl/pocillo de BSA 1% en PBS. Después de la adición de 60 µl de PEPD humana recombinante diluida en serie en cada pocillo, 60 µl de lisados celulares (preparados a partir de células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío durante 24 h y células CHO-K1 transfectadas con ErbB2 de tipo salvaje durante 24 h), que contiene 25 µg de proteína total por muestra (nota: un experimento preliminar con hasta 250 µg de proteína total por muestra mostró un resultado similar de unión de PEPD a ErbB2), se añadieron a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Después de tres lavados con PBST, se añadieron a cada pocillo 100 µl de un anticuerpo anti-His conjugado con biotina (dilución 1: 10,000; cabe mencionar que la PEPD está marcada con His) y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de otra ronda de lavado con PBST, se añadieron 100 µl de HRP conjugada con estreptavidina (dilución 1: 10,000) a cada pocillo y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de otra ronda de lavado con PBST, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de sustrato 1x (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y, después del desarrollo de color adecuado, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de detención (H₂SO₄ 1 N) y se registró la lectura de absorbancia a 450 nm. En experimentos que comparan la unión de PEPD a ErbB2 de tipo salvaje y sus mutantes de supresión (supresión de los subdominios 1, 2, 3 o 4 en el ECD de ErbB2), se utilizaron cantidades iguales de proteína ErbB2 de tipo salvaje y sus mutantes. Los lisados de células transfectadas con el plásmido que expresa cada proteína (durante 24 h) se sometieron primero a un análisis de electrotransferencia, seguido de una medición de densitometría de las bandas de proteínas específicas normalizadas a un control de carga, para calcular la cantidad de lisados que liberan la misma cantidad de cada proteína (se utilizaron 25 µg de proteína total/muestra para los lisados que llevan el ErbB2 de tipo salvaje).

20

Medición de la concentración de PEPD por ELISA. Para medir las concentraciones de PEPD, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti-PEPD diluido de ratón (2,5 µg/ml) a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron tres veces con solución salina tampón de fosfato con Tween 20 (PBST) y se bloquearon con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (incubación durante al menos 2 horas a temperatura ambiente). Las placas se lavaron con PBST y luego se incubaron con 100 µl/pocillo de estándar de PEPD o muestras, que se diluyeron adecuadamente, durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBST y cada pocillo se incubó luego con 100 µl de un anticuerpo de detección (un anticuerpo anti-PEPD policlonal de conejo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con PBST, se añadieron 100 µl de reactivo secundario (IgG-HRP anti-conejo de cabra) a cada pocillo, seguido de 1 h de incubación a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo con PBST tres veces y luego cada pocillo se incubó con 100 µl de una solución de sustrato HRP (sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina de Cell Signaling, #7004). Después de un desarrollo de color adecuado, se añadieron 100 µl de solución de detención (Cell Signaling, #7002) a cada pocillo y se registró la absorbancia a 450 nm mediante un lector de placas de microtitulación. Se utilizó PEPD puro como estándar.

Tinción con inmunofluorescencia y microscopia confocal. Las células se cultivaron en portaobjetos de cámara (1,5 x 10⁴ células/pocillo) durante la noche, seguido de un tratamiento con PEPD o vehículo. Luego, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo, se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente con PBS enfriado con hielo, y se bloquearon con BSA 1% en PBS durante 45 min a temperatura ambiente. Luego, las células se incubaron con un anticuerpo ErbB2 durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con PBS, se incubaron con un anticuerpo marcado con His conjugado con FITC (para detección de PEPD) y un anticuerpo secundario conjugado con TRITC (para detección de ErbB2) durante 1 h a temperatura ambiente, y se lavaron nuevamente con PBS. Luego se examinaron las células con un microscopio confocal Zeiss LSM 510.

RT-PCR. Se aisló el ARN total usando el kit de RNeasy Mini (Qiagen), y después del tratamiento con TURBO DNasa para eliminar la posible contaminación del ADN genómico, se transcribieron de forma inversa 500 ng de ARN por muestra en ADNc en una reacción de 25 µl usando los reactivos de transcripción inversa TaqMan (Invitrogen). La reacción RT se realizó a 25 °C durante 10 min, seguido de calentamiento a 48 °C durante 30 min, y luego a 95 °C durante 5 min. Cada amplificación de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl, que contiene 10 µl de la mezcla maestra GoTaq (2x) (Promega), 0,5-1 µl de la mezcla de transcripción inversa (ADNc), 0,25 µM de cada uno de los cebadores directos e inversos específicos. Los cebadores son los siguientes: ERBB2 humano, directo, 5'-CTGTTTGCCGTGCCACCCTGAGT-3' (SEQ ID NO: 8), inverso, 5'-CTT CT GCTGCCGTGCTTGATGAG-3' (SEQ ID NO: 9); GAPDH humano, directo, 5'-CCAGGGCTGCTTTAACTC-3' (SEQ ID NO: 10), inverso, 5'-GCTCCCCCCTGCAAATGA-3' (SEQ ID NO: 11); GAPDH de hámster chino, directo, 5'-TGGAATCTACTGGCGTCTTC-3' (SEQ ID NO: 12), inverso, 5'-CACCACCTTCTTGATGTCCT-3' (SEQ ID NO: 13). Las condiciones de PCR utilizadas para todas las reacciones son las siguientes: 94 °C durante 3 minutos, 28 ciclos (ERBB2 humano)/25 ciclos (GAPDH) a 94 °C (desnaturalización) durante 30 segundos, 63 °C (ERBB2 humano)/60 °C (GAPDH humano)/56 °C (GAPDH de hámster chino) durante 30 segundos (apareamiento) y 72 °C durante 30 segundos (extensión); La extensión final se realizó a 72 °C durante 5 min. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis con gel de agarosa 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV.

60

Ensayo de BrdU. La incorporación de BrdU en el ADN se midió usando el kit de flujo **FITC BrdU** (BD Pharmingen). Brevemente, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos ($0,15 \times 10^6$ células/pocillo para células CHO-K1 y células CHO-K1/ErbB2, $0,4 \times 10^6$ células/pocillo para células BT-474; 2 ml de medio/pocillo) durante la noche, se trataron con vehículo o PEPD durante 48 h, y luego se incubaron con BrdU a $10 \mu\text{M}$ en medio de cultivo durante 30 min (células CHO-K1 y CHO-K1/ErbB2) o 18 h (células BT-474). Las células luego se recogieron, se fijaron y se permeabilizaron en un tampón de fijación/permeabilización, se trataron con NDasa durante 1 hora a 37°C y se incubaron con un anticuerpo BrdU durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de tinción de ADN con 7-amino-actinomicina D. Las células teñidas se resuspendieron en 0,5-1 ml de tampón de tinción por muestra y se analizaron mediante un citómetro de flujo (BD FACS Calibur, BD Biosciences), contando 10,000 células por muestra. La incorporación de BrdU se modeló utilizando el software WinMDI 2,8.

Ensayo de formación de colonia en agar blando. Después de que 1 ml de agar Noble ultrapuro 0,8% (USB, cat#10907) en medio de cultivo se solidificó en cada pocillo de placas de 6 pocillos, 1 ml de células (2×10^4 células BT-474, 1×10^3 células CHO-K1 o 1×10^3 células CHO-K1/ ErbB2) suspendidas en agar 0,4% en medio de cultivo a 37°C se añadieron a cada pocillo, lo que también se solidificó después. Luego se añadió PEPD o vehículo en 2 ml de medio a cada pocillo, que se cambió cada 3-4 días durante un total de 21 días. Al final de este tratamiento, se contaron las colonias celulares de $\geq 100 \mu\text{m}$ de diámetro bajo un microscopio de disección (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss) en 10 campos diferentes (10 aumentos) por pocillo, con la ayuda de ImageJ.

Ensayo de invasión y migración celular. La invasión y migración celular se midieron utilizando las cámaras **BD BioCoat Matrigel Invasion** (BD Biosciences). Brevemente, la cámara inferior se llenó con 0,75 ml de medio con FBS 10%, y la cámara superior se colocó con 4×10^4 células suspendidas en 0,5 ml de medio libre de suero que contiene vehículo o PEPD. Las cámaras se colocaron en una incubadora de cultivo celular a 37°C durante 48 h. Al final de la incubación, las células que invadieron a través de una capa de matriz de Matrigel recubierta en el inserto de filtro que se colocó en el fondo de la cámara de invasión se fijaron con metanol 100%, se tiñeron con violeta de cristal 0,5% y se contaron bajo un Microscopio (Eclipse 50i) en 10 campos diferentes (20 aumentos) por filtro, asistido por ImageJ.

Ensayo de PI3 quinasa. Se usó un kit ELISA de actividad de PI3-quinasa (Echelon, K-1000s). Brevemente, se extrajo PI3K de lisados celulares completos (preparados a partir de aproximadamente 1×10^6 células por muestra) usando un anticuerpo PI3K (anti-PI3K p85), y los inmunoprecipitados se mezclaron con 30 μl de tampón de reacción KBZ, que luego se mezcló con 30 μl de sustrato PI(4,5) P₂ $10 \mu\text{M}$, seguido de incubación durante 2 horas a 37°C . La reacción de la quinasa se terminó mediante la adición de 90 μl de solución de detención de quinasa a cada solución de reacción, y se transfirieron 60 μl de cada solución de reacción de la quinasa detenida junto con 60 μl de detector de PIP₃ a cada pocillo en la placa de incubación. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 60 min, se transfirieron 100 μl por muestra de la placa de incubación a los pocillos correspondientes de la placa de detección y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con TBST y luego se incubaron con el detector secundario conjugado con HRP durante 30 minutos, seguido de lavado con TBST, y se midió HRP inmovilizada mediante un ensayo colorimétrico estándar, utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato.

Ensayo de Src quinasa. La actividad de Src en lisados celulares se midió utilizando el kit de ensayo de tirosina quinasa universal (TaKaRa, #MK410). Brevemente, los lisados (preparados a partir de aproximadamente 1×10^6 células por muestra) se clarificaron previamente con perlas de proteína A-agarosa antes de IP con un anticuerpo Src. Los inmunoprecipitados se lavaron e incubaron con β -mercaptoetanol 10 mM en 150 μl de solución de reacción de quinasa. Cada muestra (40 μl) se mezcló con 10 μl de solución de ATP-2Na 40 mM, que se transfirió a los pocillos de la placa de microtitulación recubiertos con un sustrato de PTK, seguido de incubación a 37°C durante 30 minutos. Después del lavado con TBST, se añadió una solución de anti-fosfotirosina conjugada (**PY20**) con HRP a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a 37°C . Después de otra ronda de lavado con TBST, la HRP inmovilizada se midió mediante un ensayo colorimétrico estándar, utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como un sustrato.

Ensayo de proliferación celular MTT. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos (500 células CHO-K1 o células CHO-K1/ErbB2 por pocillo, 2,000 células BT-474 por pocillo; 150 μl de medio por pocillo) durante la noche y luego se trataron con vehículo, PEPD, G278D-PEPD o trastuzumab en 200 μl de medio por pocillo durante 72 h, seguido de incubación con MTT (9,2 mM en medio) a 37°C durante 3 h. Las células se lavaron luego con PBS y se mezclaron con dimetilsulfóxido (150 μl por pocillo), y se determinó la densidad celular mediante la medición de MTT a formazán espectroscópicamente a 570 nm.

Análisis estadístico. La prueba t de Student y ANOVA se utilizaron para la comparación de dos grupos y la comparación de múltiples grupos, respectivamente. Todas las pruebas fueron de dos colas y se realizaron a un nivel de significación nominal de 0,05, es decir, un valor de P de 0,05 o inferior se consideró estadísticamente significativo.

60

Aunque la invención se ha descrito a través de ejemplos ilustrativos, las modificaciones de rutina serán evidentes para los expertos en la técnica, tales modificaciones están dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Health Research, Inc.

<120> MÉTODO DE PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE CÁNCERES ERBB2-POSITIVOS

10

<130> 003551.00577

<150> 61/870,054

<151> 2013-08-26

15

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20

<211> 493

<212> PRT

<213> Humano

<400> 1

ES 2 711 558 T3

Met Ala Ala Ala Thr Gly Pro Ser Phe Trp Leu Gly Asn Glu Thr Leu
 1 5 10 15

Lys Val Pro Leu Ala Leu Phe Ala Leu Asn Arg Gln Arg Leu Cys Glu
 20 25 30

Arg Leu Arg Lys Asn Pro Ala Val Gln Ala Gly Ser Ile Val Val Leu
 35 40 45

Gln Gly Gly Glu Glu Thr Gln Arg Tyr Cys Thr Asp Thr Gly Val Leu
 50 55 60

Phe Leu Gln Glu Ser Phe Phe His Trp Ala Phe Gly Val Thr Glu Pro
 65 70 75 80

Gly Cys Tyr Gly Val Ile Asp Val Asp Thr Gly Lys Ser Thr Leu Phe
 85 90 95

Val Pro Arg Leu Pro Ala Ser His Ala Thr Trp Met Gly Lys Ile His
 100 105 110

Ser Lys Glu His Phe Lys Glu Lys Tyr Ala Val Asp Asp Val Gln Tyr
 115 120 125

Val Asp Glu Ile Ala Ser Val Leu Thr Ser Gln Lys Pro Ser Val Leu
 130 135 140

Leu Thr Leu Arg Gly Val Asn Thr Asp Ser Gly Ser Val Cys Arg Glu
 145 150 155 160

Ala Ser Phe Asp Gly Ile Ser Lys Phe Glu Val Asn Asn Thr Ile Leu

ES 2 711 558 T3

Phe Ile Asp His Leu Leu Asp Glu Ala Leu Ala Asp Pro Ala Arg Ala
 420 425 430

Ser Phe Leu Asn Arg Glu Val Leu Gln Arg Phe Arg Gly Phe Gly Gly
 435 440 445

Val Arg Ile Glu Glu Asp Val Val Val Ile Asp Ser Gly Ile Glu Leu
 450 455 460

Leu Thr Cys Val Pro Arg Thr Val Glu Glu Ile Glu Ala Cys Met Ala
 465 470 475 480

Gly Cys Asp Lys Ala Phe Thr Pro Phe Ser Gly Pro Lys
 485 490

<210> 2
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

10
 <400> 2
 aatacgactc actatagggc g 21

<210> 3
 15 <211> 17
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 20 <223> cebador

<400> 3
 cttggggcca gagaagg 17

25 <210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 ataagaatgc ggccgcagct gagattcccc tccatt 36

35
 <210> 5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40
 <220>
 <223> cebador
 <400> 5

ES 2 711 558 T3

atagtttagc ggccgccttg atgccagcag aagtca 36

<210> 6
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

10 <400> 6
 caaatgggcg gtaggcgtg a 21

<210> 7
 15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 20 <223> cebador

<400> 7
 attggtgggc aggtagtgga gttc 24

<210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 30 <223> cebador

<400> 8
 ctgtttgccg tgccaccctg agt 23

35 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 9
 45 ctctgctgc cgtcgcttga tgag 24

<210> 10
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

55 <400> 10
 ccagggctgc ttttaactc 19
 <210> 11
 <211> 18
 60 <212> ADN

ES 2 711 558 T3

<213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

5 <400> 11
gctccccct gcaaatga 18

<210> 12
10 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
15 <223> cebador

<400> 12
tggaatctac tggcgtctc 20

20 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador

<400> 13
caccacctc ttgatgcct 20

30

REIVINDICACIONES

1. Una preparación farmacéutica para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo, donde la preparación comprende una peptidasa D (PEPD) aislada o producida de forma recombinante y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.
2. La preparación farmacéutica para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la PEPD es un componente de una proteína de fusión.
- 10 3. La preparación farmacéutica para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 2, donde la proteína de fusión comprende la PEPD y una marca de polihistidina.
4. La composición farmacéutica para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la PEPD se acopla a un agente quimioterapéutico.
- 15 5. La preparación farmacéutica para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 2, donde la proteína de fusión comprende la PEPD y una región Fc de una inmunoglobulina.
6. La preparación farmacéutica para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la PEPD tiene menos actividad de hidrólisis dipeptídica en comparación con una PEPD que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y donde la PEPD comprende una mutación de glicina en la posición 278 de la SEQ ID NO: 1
- 20 7. La preparación farmacéutica para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 1, la preparación también comprende un inhibidor de la coagulación.
- 25 8. Peptidasa D (PEPD) para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo en un individuo.
9. Peptidasa D para usar en un método para la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 8, donde la PEPD tiene menos actividad de hidrólisis dipeptídica en comparación con una PEPD que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y donde la PEPD comprende una mutación de glicina en la posición 278 de la SEQ ID NO: 1.
- 30 10. Peptidasa D para usar en un método para la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 8, donde la peptidasa D está comprendida en una composición, donde tal composición además comprende un inhibidor de la coagulación.
- 35 11. Peptidasa D para usar en un método para la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde la PEPD es un componente de una proteína de fusión.
- 40 12. Peptidasa D para usar en un método para la terapia del cáncer ErbB2-positivo de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, donde la PEPD está conjugada con un agente quimioterapéutico.
13. Un producto para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo, donde el producto comprende al menos un recipiente sellado que contiene una preparación farmacéutica que comprende peptidasa D (PEPD), donde la PEPD tiene menos actividad de hidrólisis dipeptídica en comparación con una PEPD que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 y donde la PEPD comprende una mutación de glicina en la posición 278 de la SEQ ID NO: 1.
- 45 14. El producto para usar en la terapia del cáncer ErbB2-positivo de la reivindicación 12, donde el producto además comprende un inhibidor de coagulación.
- 50

Figura 1

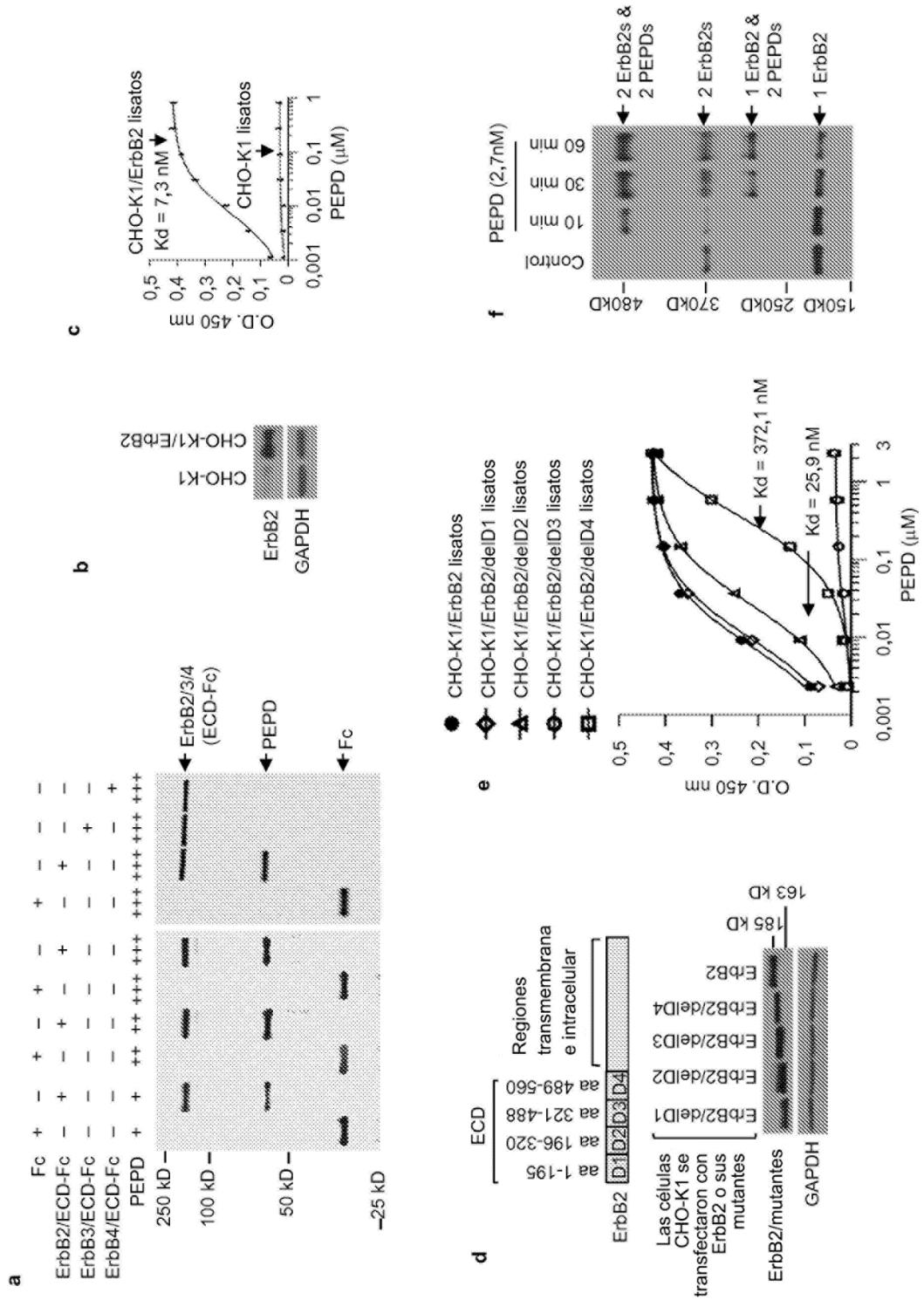


Figura 2

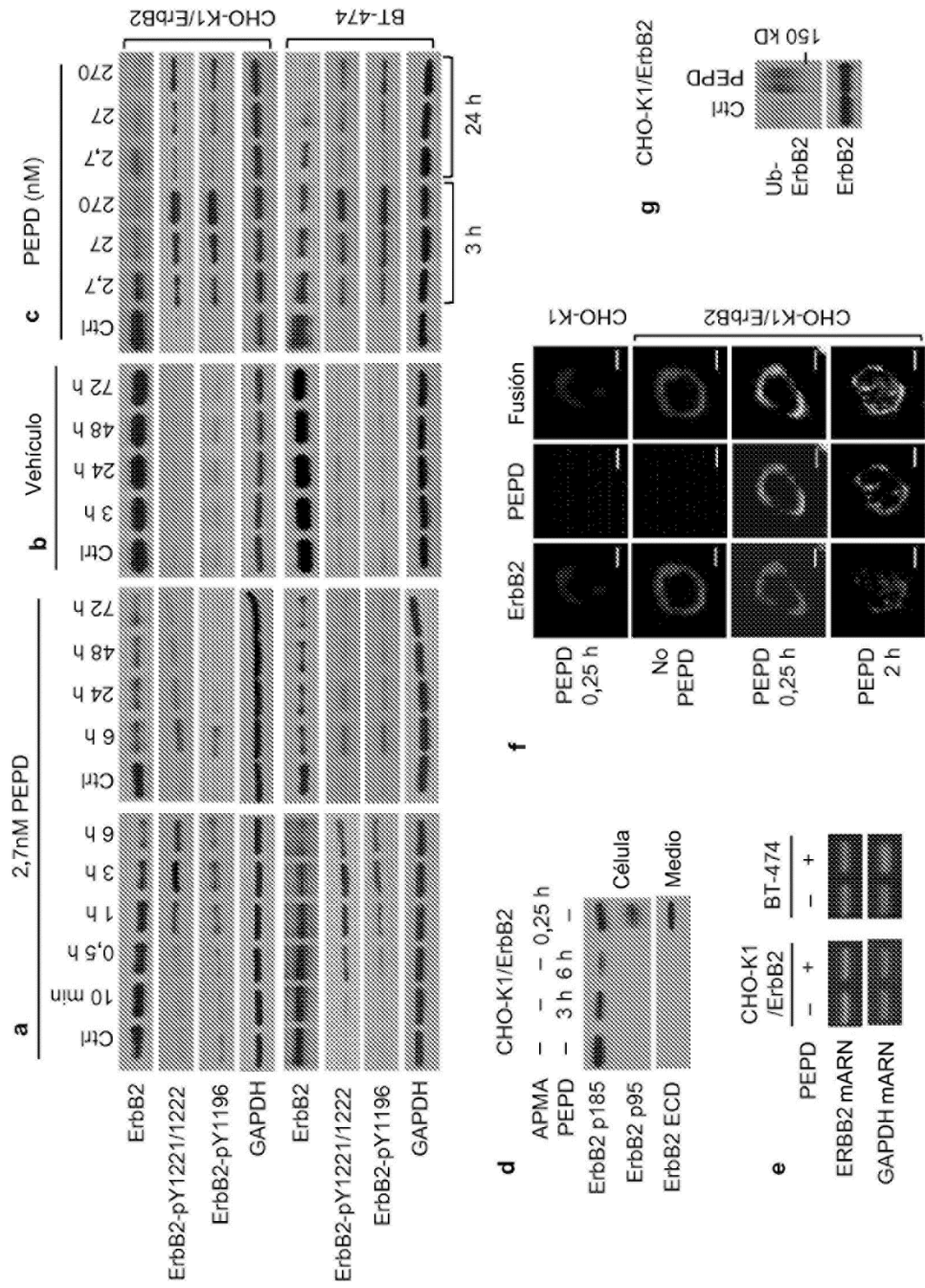


Figura 4

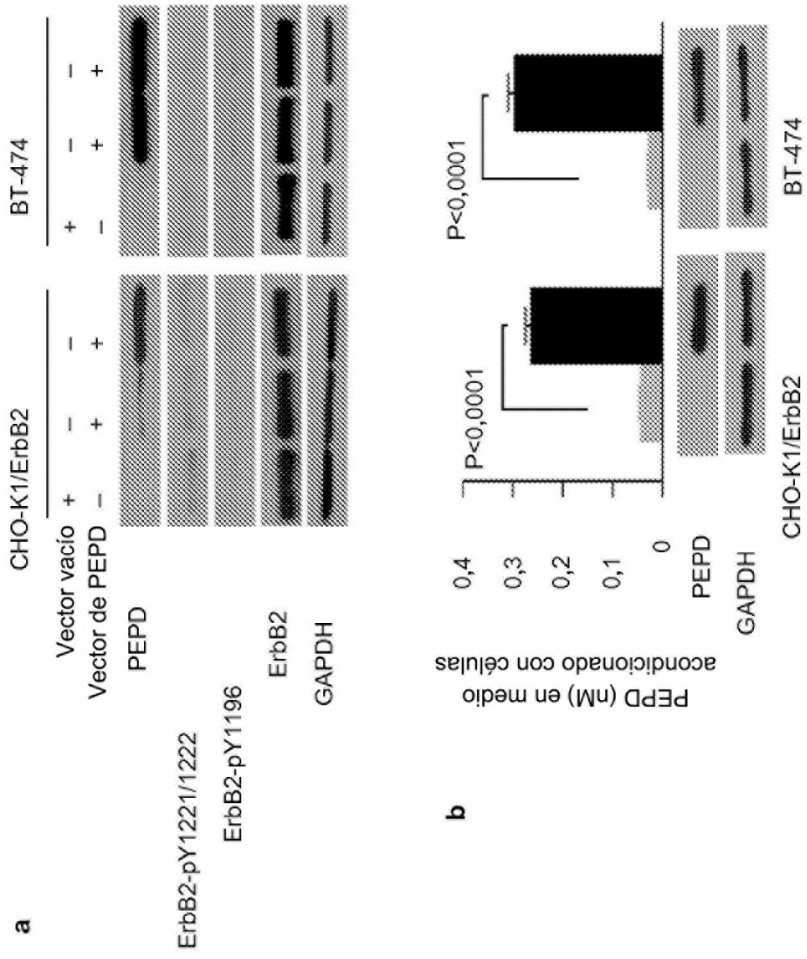


Figura 5

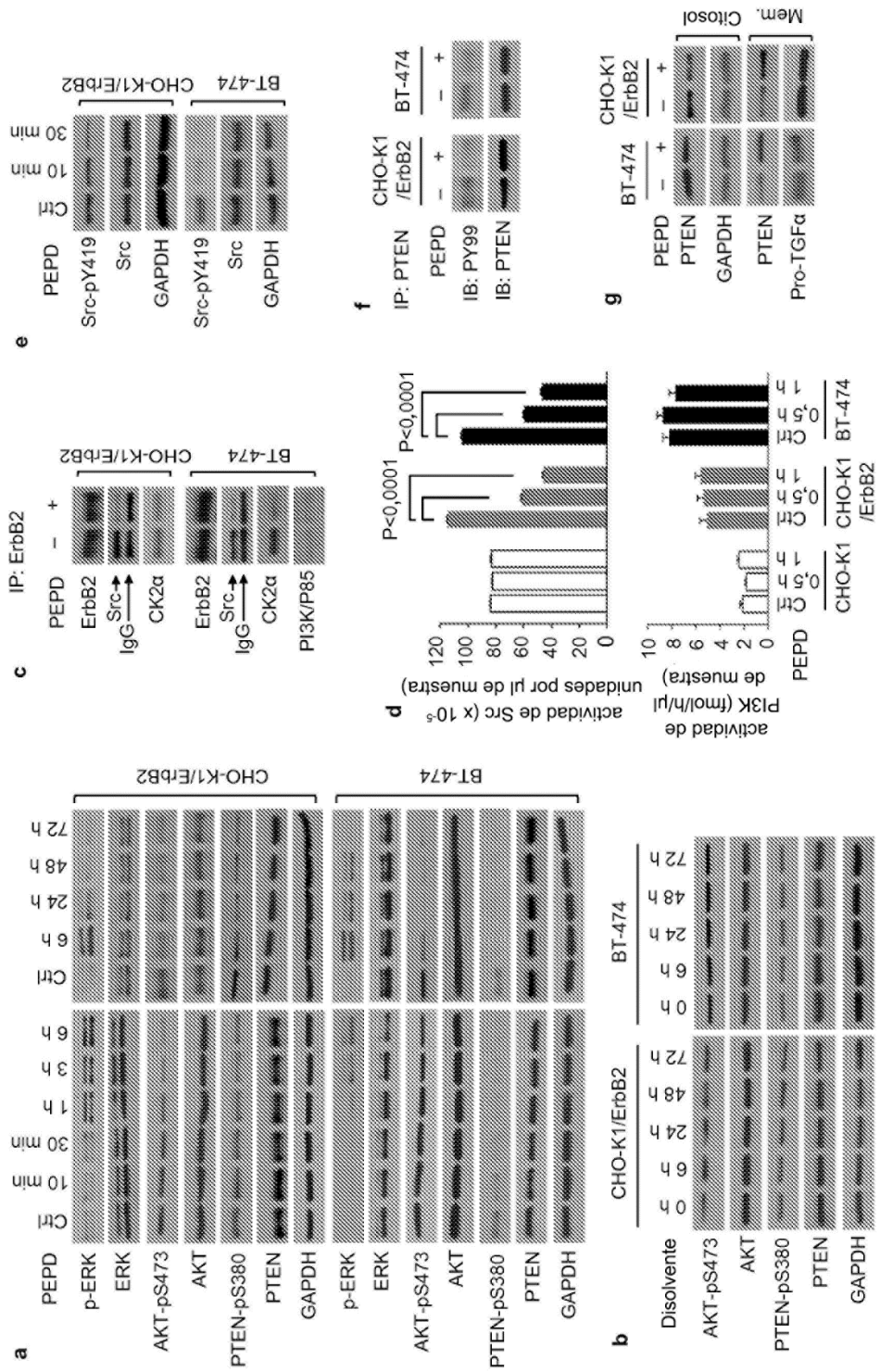


Figura 6

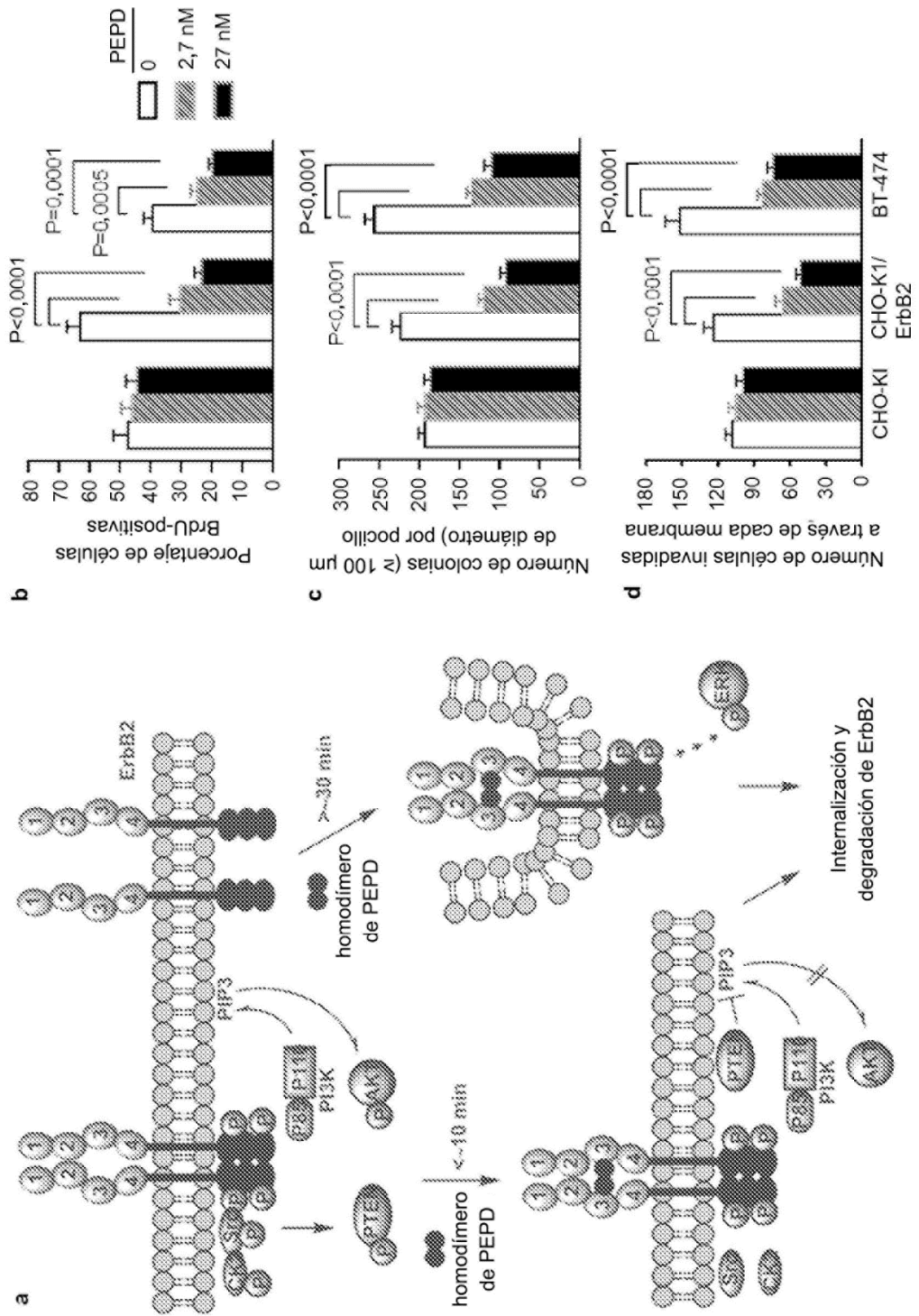
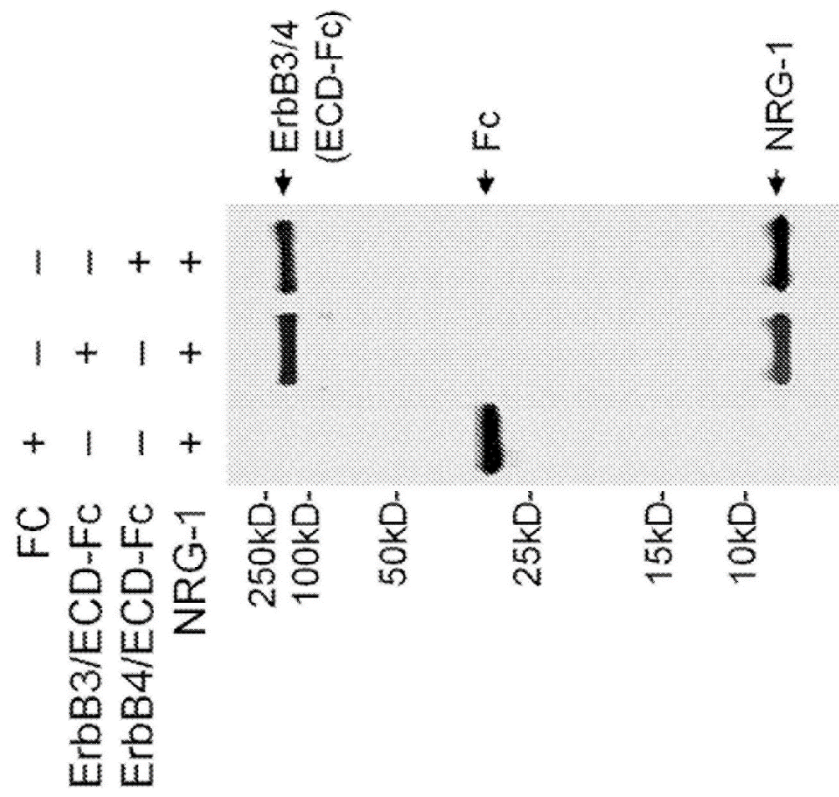


Figura 7



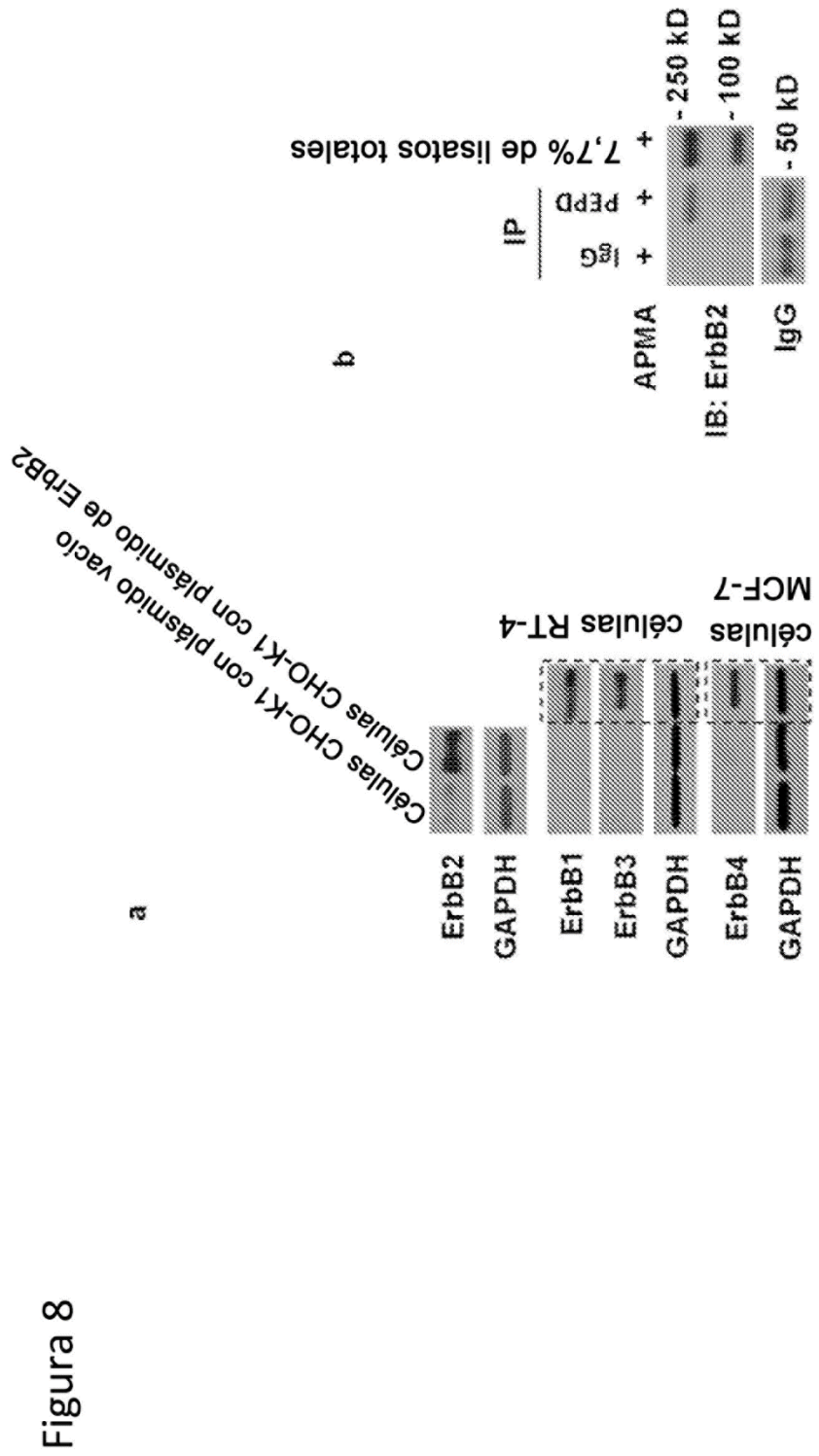


Figura 9

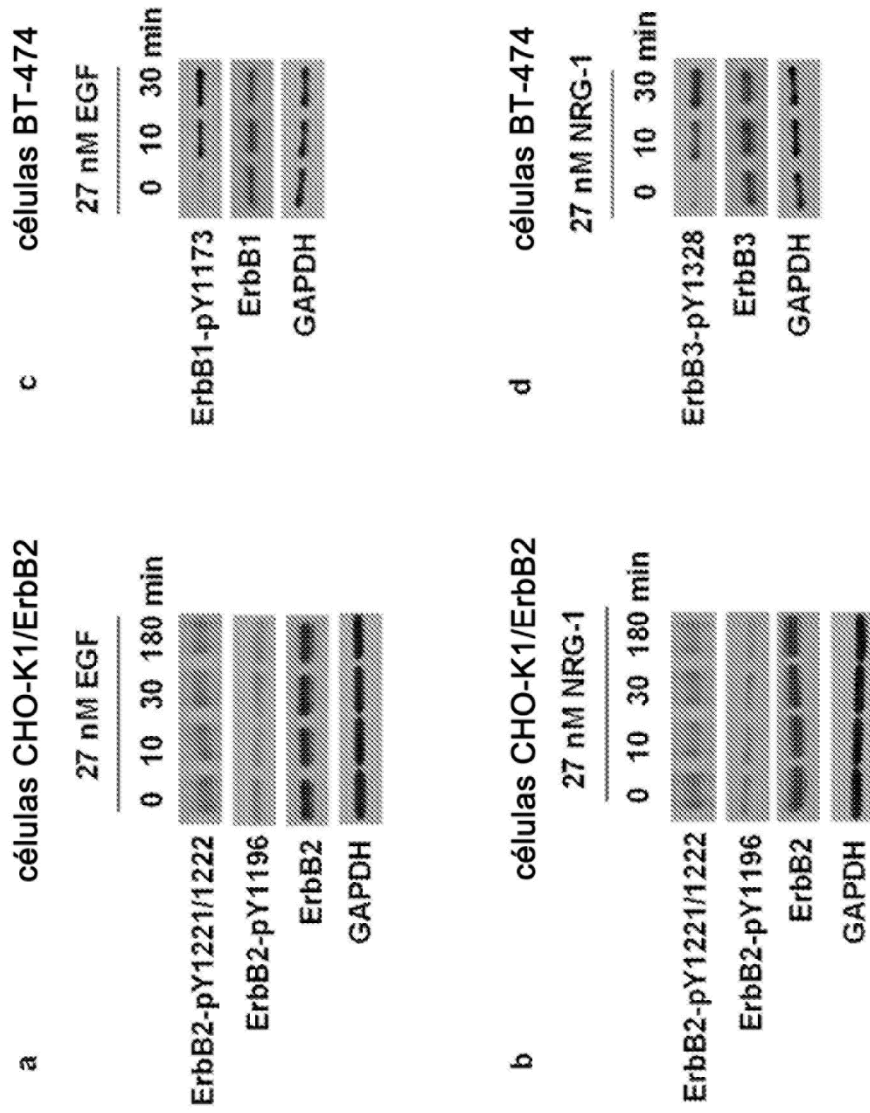


Figura 10

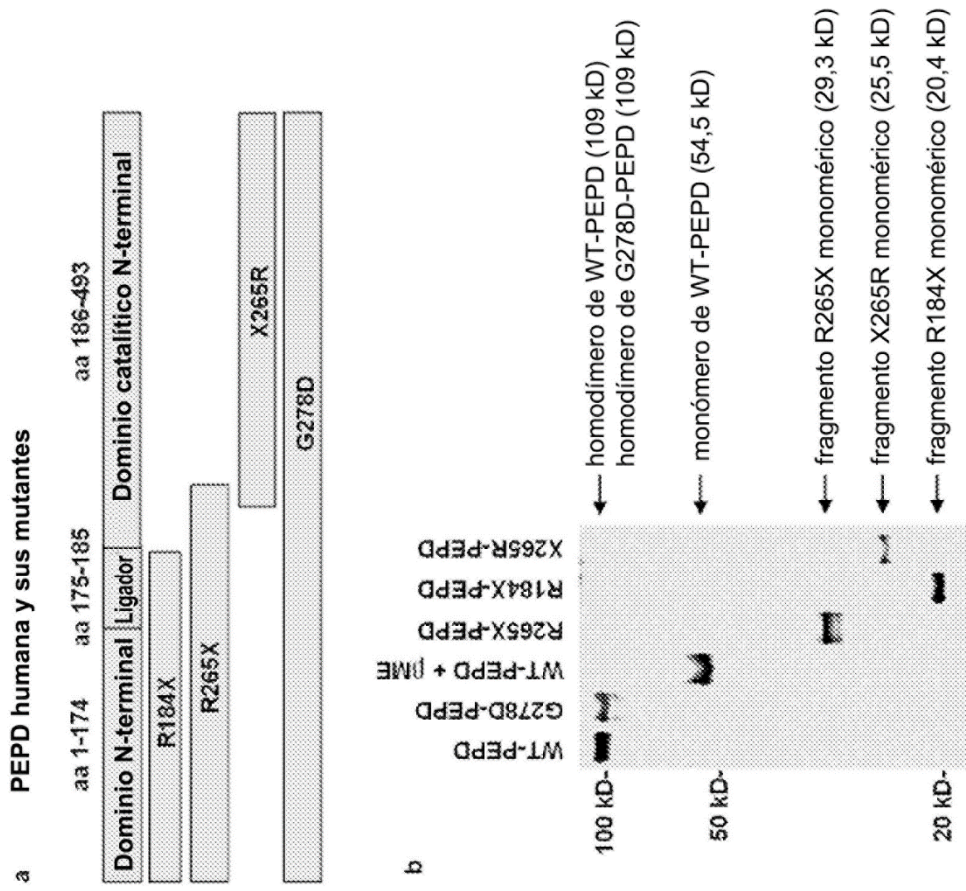


Figura 11

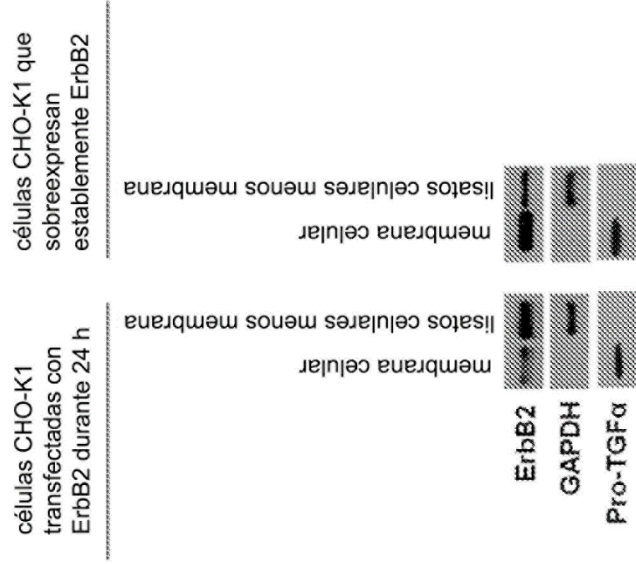


Figura 12

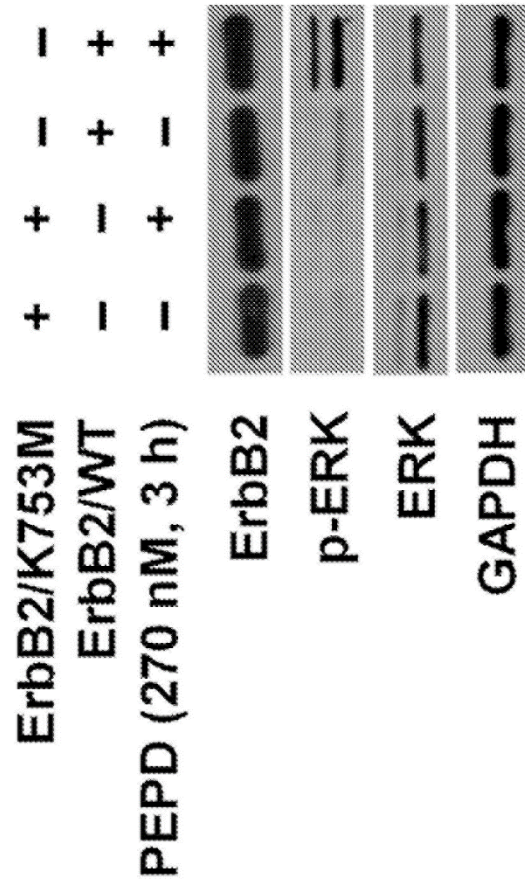


Figura 13

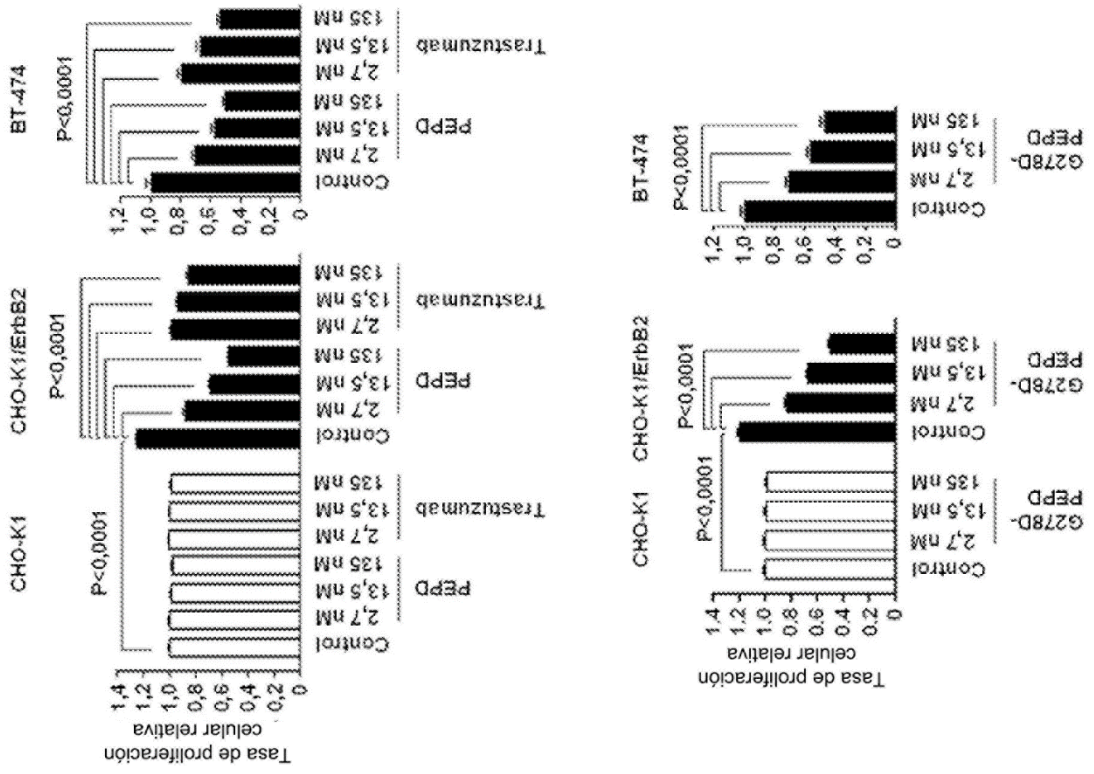


Figura 14

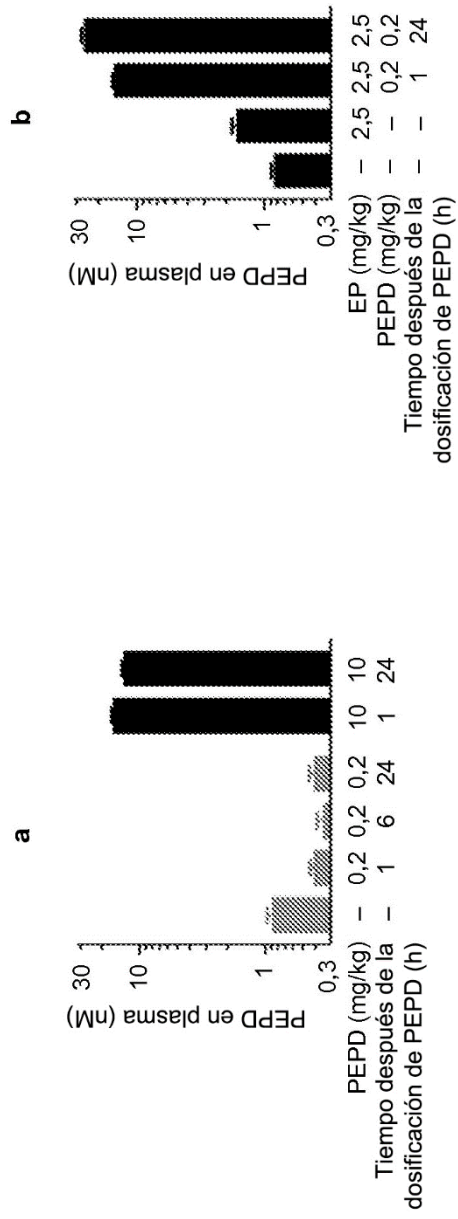


Figura 15

Ratones que llevan tumor CHO-K1/ErbB2

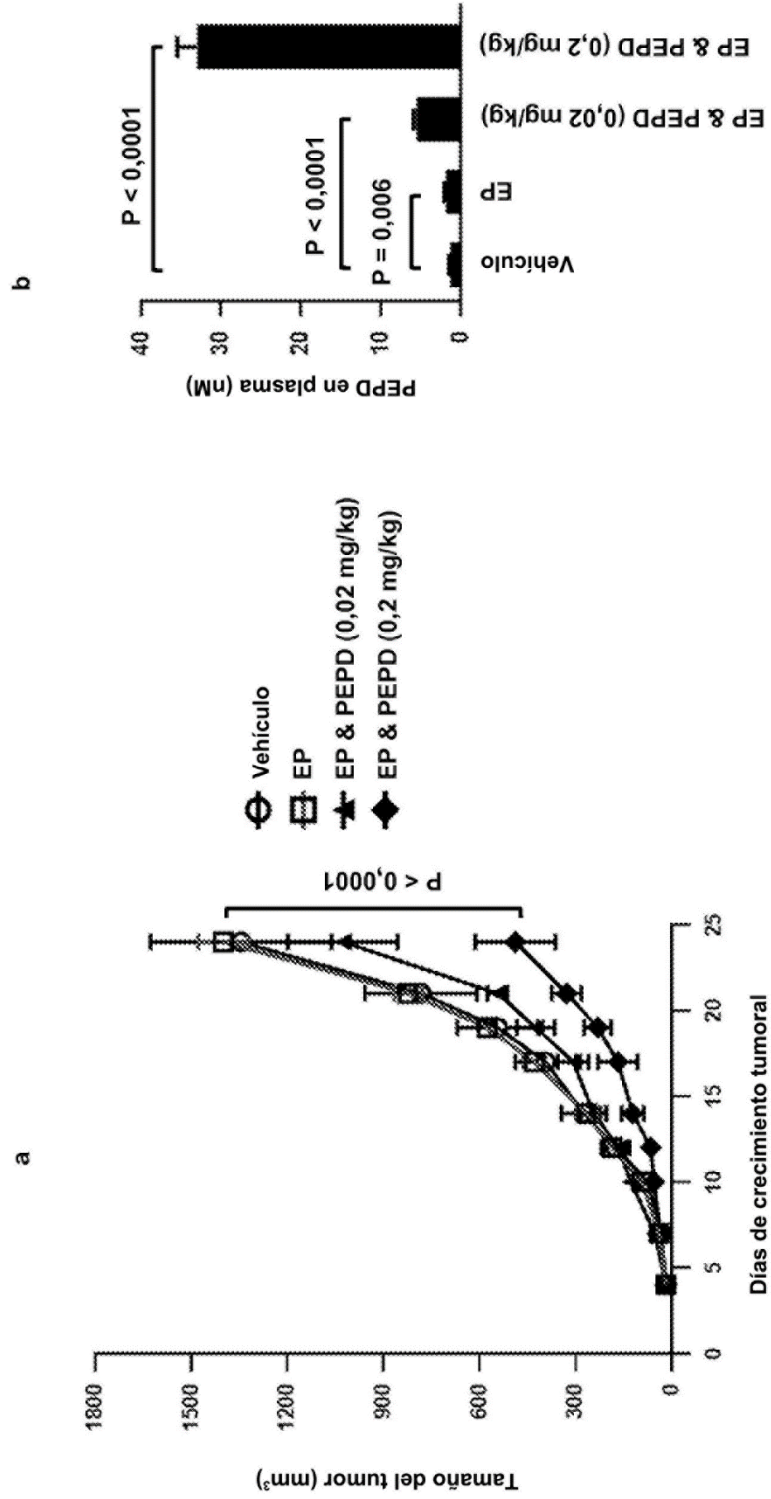
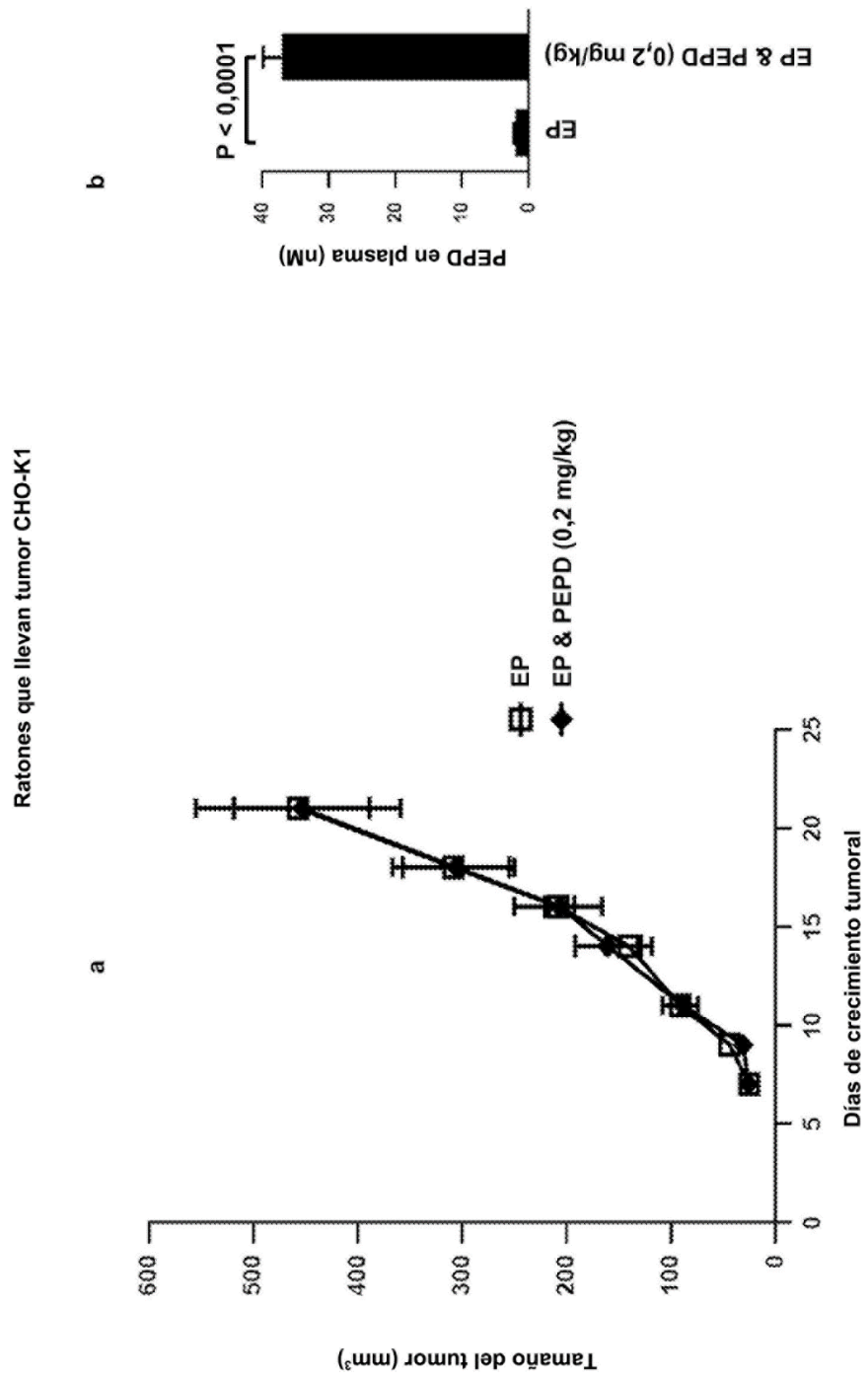


Figura 16



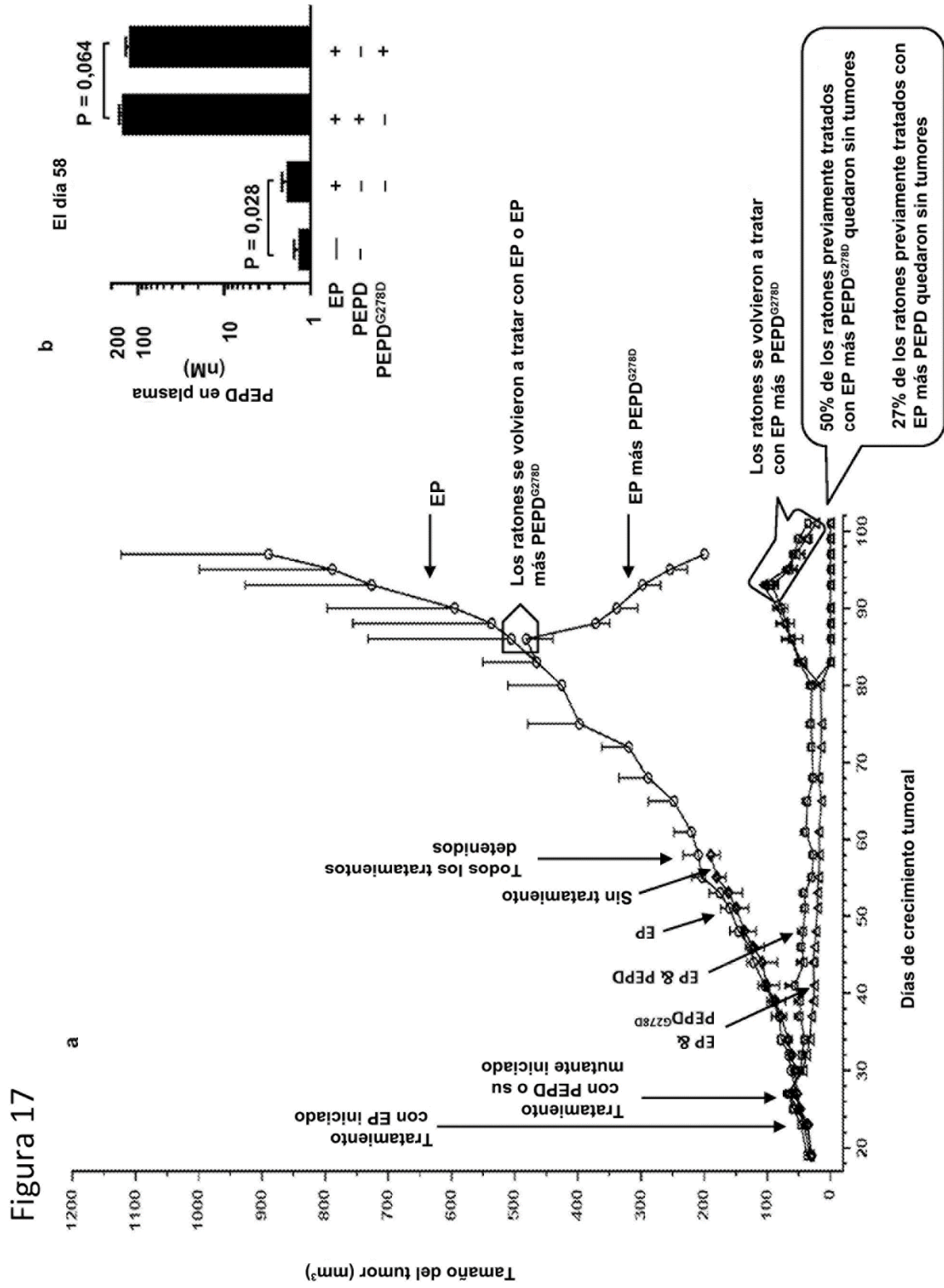


Figura 18

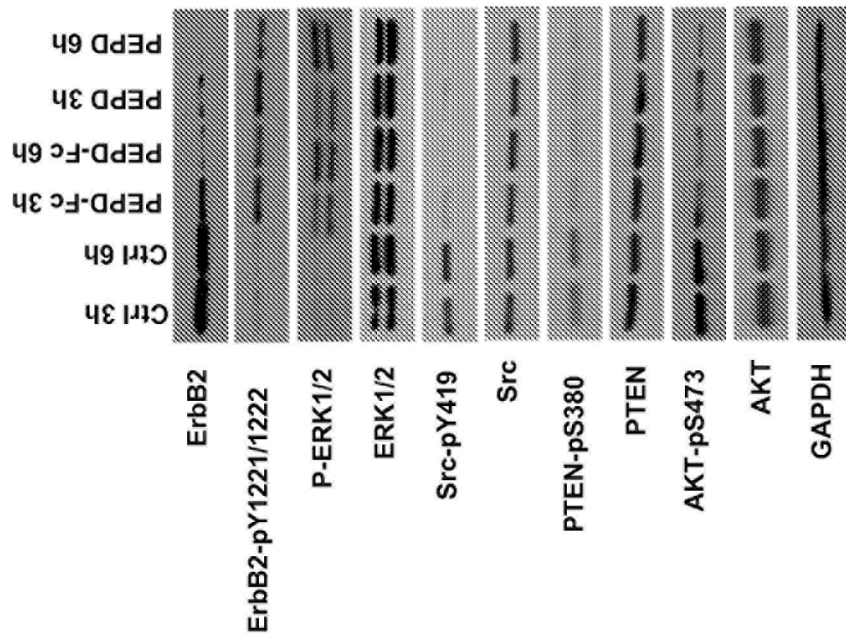


Figura 19

