



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 861 587**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/26** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2017 PCT/EP2017/050037**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017 WO17114976**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2017 E 17700483 (5)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3397967**

---

④ Título: **Composiciones y métodos para detectar y tratar el cáncer de esófago**

⑩ Prioridad:

**31.12.2015 EP 15307189  
05.02.2016 EP 16305139**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**06.10.2021**

⑩ Titular/es:

**PROGASTRINE ET CANCERS S.À R.L. (100.0%)  
11, Côte d'Eich  
1450 Luxembourg, LU**

⑦ Inventor/es:

**PRIEUR, ALEXANDRE**

⑧ Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**ES 2 861 587 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**

Composiciones y métodos para detectar y tratar el cáncer de esófago

5 **Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere al diagnóstico *in vitro*, a la prevención y al tratamiento de cáncer, más particularmente se refiere a métodos para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago, y a métodos y a 10 composiciones para la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago. Las composiciones según la divulgación comprenden una molécula de unión a progastrina, en particular un anticuerpo anti-hPG, mientras que los métodos según la divulgación comprenden la utilización de una molécula de unión a progastrina, y particularmente un anticuerpo anti-hPG.

15 **Antecedentes**

15 El cáncer de esófago surge a partir de células del esófago, en el tracto entre la garganta y el estómago, y se ha descrito como el octavo cáncer más común, afectando más a hombres que a mujeres y con tasas que varían ampliamente entre países.

20 Los dos tipos más comunes de cáncer de esófago son el carcinoma de células escamosas de esófago y el adenocarcinoma de esófago. Asimismo se conocen varios subtipos más raros. El carcinoma de células escamosas surge a partir las células epiteliales del esófago, mientras que el adenocarcinoma surge a partir de las células glandulares presentes en la parte inferior del esófago.

25 El diagnóstico clínico se basa en una biopsia, que habitualmente se realiza mediante endoscopia. El mal desenlace de esta enfermedad se debe en particular a un diagnóstico tardío, debido en particular a la ausencia de signos y síntomas tempranos. Aping Yuan y colaboradores han investigado la expresión de gastrina, precursores de gastrina y receptor de gastrina en el carcinoma de células escamosas de esófago (ESCC) (Aping Yuan *et al.*, Pathology Oncology Research 2008). Sin embargo, hasta la fecha, no existen biomarcadores moleculares que se 30 hayan traducido en una práctica clínica generalizada del cáncer de esófago (Kaz *et al.*, Cancer Letters, 2014). Los tratamientos dependen del desarrollo del cáncer y, habitualmente, incluyen cirugía para tumores localizados pequeños, o quimioterapia, posiblemente en combinación con radioterapia. Yushan Zhang *et al.*, Anticancer Research 26: 2963-2970 (2006) dan a conocer un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de superficie de 40 35 kDa que presenta potencial terapéutico para el cáncer de esófago.

35 Por tanto, todavía existe la necesidad de métodos que permitan un diagnóstico rápido, fiable y rentable del cáncer de esófago, ya que todavía existe la necesidad de nuevas composiciones y métodos para la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago

40 **Sumario**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o forma de realización que se exponga en la presente memoria es únicamente para información.

45 La presente divulgación proporciona a continuación métodos para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago, en los que dicho método comprende detectar progastrina en una muestra biológica de un sujeto. Preferentemente, se determina la cantidad de progastrina en dicha muestra, permitiendo de ese modo la cuantificación de progastrina. La presente divulgación asimismo proporciona una composición para su utilización en la prevención o el 50 tratamiento del cáncer de esófago, en la que dicha composición comprende un anticuerpo que se une a progastrina, y métodos para la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago que comprenden la utilización de una composición que comprende un anticuerpo que se une a progastrina, solo o en combinación con cualquier otro método de prevención o terapéutico conocido contra el cáncer de esófago.

55 **Descripción detallada**

55 La preprogastrina humana, un péptido de 101 aminoácidos (referencia de la secuencia de aminoácidos: AAB19304.1), es el principal producto de traducción del gen de gastrina. La progastrina se forma por la escisión de los primeros 21 aminoácidos (el péptido señal) de la preprogastrina. La cadena de 80 aminoácidos de la progastrina se procesa adicionalmente mediante escisión y enzimas modificantes para proporcionar varias formas de la hormona gastrina biológicamente activas: gastrina 34 (G34) y gastrina 34 extendida con glicina (G34-Gly), que comprenden los aminoácidos 38-71 de la progastrina, gastrina 17 (G17) y gastrina 17 extendida con glicina (G17-Gly), que comprenden los aminoácidos 55 a 71 de la progastrina.

65 Se han descrito anticuerpos monoclonales antiprogastrina humana (anti-hPG) y su utilización para diagnóstico o terapia en los siguientes documentos: WO 2011/083 088 para el cáncer colorrectal, WO 2011/083 090 para el cáncer de mama, WO 2011/083 091 para el cáncer de páncreas, WO 2011/116 954 para el cáncer colorrectal y

gastrointestinal y WO 2012/013 609 y WO 2011/083089 para patologías hepáticas.

En primer lugar, la presente divulgación se refiere a un método para la evaluación *in vitro* de un riesgo de presencia de cáncer de esófago, en el que dicho método comprende una etapa de detección de progastrina en una muestra biológica de un sujeto. La presencia de progastrina en la muestra indica que existe un riesgo de presencia de cáncer de esófago.

Por tanto, en la presente memoria se da a conocer un método *in vitro* para evaluar el riesgo de presencia de cáncer de esófago en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- 10 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, y
- 15 b) detectar la unión a progastrina de dicha molécula de unión a progastrina en dicha muestra, en el que dicha unión indica un riesgo de presencia de cáncer de esófago.

La unión de la molécula de unión a progastrina puede detectarse mediante diversos ensayos disponibles para el experto. Aunque en la divulgación se incluye cualquier medio adecuado para llevar a cabo los ensayos, puede mencionarse en particular FACS, ELISA, RIA, inmunotransferencia de tipo Western e IHC.

20 Preferentemente, el método dado a conocer en la presente memoria para la evaluación *in vitro* de un riesgo de presencia de cáncer de esófago en un sujeto comprende las etapas siguientes:

- 25 a) poner en contacto dicha muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
- b) determinar la concentración de progastrina en dicha muestra biológica, en el que una concentración de progastrina de por lo menos 10 pM en dicha muestra biológica es indicativa de un riesgo de presencia de cáncer de esófago.

30 Una vez que se determina la concentración de progastrina presente en la muestra, el resultado puede compararse con los de la(s) muestra(s) de control, que se obtiene(n) de manera similar a las muestras de prueba, pero de individuo(s) que se sabe que no padece(n) cáncer de esófago. Si la concentración de progastrina es significativamente más elevada en la muestra de prueba, puede concluirse que existe una mayor probabilidad de que el sujeto del que se deriva presente cáncer de esófago

35 Por tanto, el método dado a conocer en la presente memoria comprende preferentemente las etapas adicionales siguientes:

- 40 c) determinar una concentración de progastrina de referencia en una muestra de referencia,
- d) comparar la concentración de progastrina en dicha muestra biológica con dicha concentración de progastrina de referencia,
- e) evaluar, a partir de la comparación de la etapa d), el riesgo de presencia de cáncer de esófago

45 La presente divulgación asimismo se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer de esófago en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- 50 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, y
- b) detectar la unión a progastrina de dicha molécula de unión a progastrina en dicha muestra, en el que dicha unión indicó la presencia de cáncer de esófago en dicho sujeto.

55 Preferentemente, el método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago en un sujeto comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto dicha muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
- b) determinar el nivel o la concentración de progastrina en dicha muestra biológica, en el que una concentración de progastrina de por lo menos 10 pM en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer de esófago en dicho sujeto.

65 En particular, una concentración de progastrina de por lo menos 10 pM, por lo menos 20 pM, por lo menos 30 pM, en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer de esófago en dicho sujeto.

Preferentemente, el método dado a conocer en la presente memoria comprende las etapas adicionales siguientes:

- c) determinar una concentración de progastrina de referencia en una muestra de referencia,
- 5 d) comparar la concentración de progastrina en dicha muestra biológica con dicho nivel o dicha concentración de progastrina de referencia,
- e) diagnosticar, a partir de la comparación de la etapa d), la presencia de cáncer de esófago.

10 La divulgación asimismo se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer de esófago metastatizado en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- 15 a) poner en contacto una muestra biológica de dicho sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, y
- b) detectar la unión a progastrina de dicha molécula de unión a progastrina en dicha muestra, en el que dicha unión indica la presencia de cáncer de esófago metastatizado en dicho sujeto.

20 En la presente memoria asimismo se da a conocer un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago metastatizado en un sujeto, a partir de una muestra biológica de dicho sujeto, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- 25 a) poner en contacto dicha muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
- b) determinar mediante un ensayo bioquímico el nivel o la concentración de progastrina en dicha muestra biológica, en el que una concentración de progastrina de por lo menos 10 pM mayor en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer de esófago metastatizado en dicho sujeto.

30 En particular, una concentración de progastrina de por lo menos 10 pM, por lo menos 20 pM, por lo menos 30 pM, por lo menos 40 pM o por lo menos 50 pM en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer de esófago metastatizado en dicho sujeto.

El método dado a conocer en la presente memoria comprende preferentemente las etapas adicionales siguientes:

- 35 c) determinar una concentración de progastrina de referencia en una muestra de referencia,
- d) comparar la concentración de progastrina en dicha muestra biológica con dicho nivel o dicha concentración de progastrina de referencia,
- e) diagnosticar, a partir de la comparación de la etapa d), la presencia de cáncer de esófago metastatizado.

45 En particular, la presente divulgación se refiere a un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago en un sujeto, que comprende determinar la concentración de progastrina en una muestra biológica y comparar dicho valor obtenido con la concentración de progastrina en una muestra de referencia.

50 Más particularmente, en un método para el diagnóstico de cáncer de esófago tal como se da a conocer en la presente memoria, la muestra biológica de dicho sujeto se pone en contacto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, en el que dicha molécula de unión a progastrina es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

55 La expresión “evaluación de un riesgo de presencia de cáncer de esófago en un sujeto” designa la determinación de una probabilidad relativa de que un sujeto dado padezca cáncer de esófago, cuando se compara con un sujeto o valor de referencia. Un método según la divulgación representa una herramienta en la evaluación de dicho riesgo, en combinación con otros métodos o indicadores tales como examen clínico, biopsia y determinación del nivel de un biomarcador conocido de cáncer de esófago.

60 En particular, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago, que comprende determinar la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto, en el que dicho sujeto muestra por lo menos un síntoma clínico de cáncer de esófago. Los síntomas clínicos de cáncer de esófago incluyen pérdida de peso, dolor o dificultad al tragar, tos, indigestión y acidez.

65 Particularmente, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago, que comprende determinar la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto, en el que dicho sujeto muestra por lo menos un síntoma clínico de cáncer y/o de metástasis.

65 Por tanto, un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago según la presente divulgación puede

considerarse una herramienta dentro de un proceso de diagnóstico.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago en un sujeto, que comprende determinar la concentración de progastrina en dicha muestra biológica y determinar un biomarcador conocido de cáncer de esófago.

El término "progastrina" designa el péptido progastrina de mamífero y, en particular, la progastrina humana. Para evitar dudas, sin ninguna especificación, la expresión "progastrina humana" se refiere a la PG humana de la secuencia SEC ID Nº 1. La progastrina humana comprende principalmente un dominio N-terminal y uno C-terminal que no están presentes en las formas de hormona gastrina biológicamente activas mencionadas anteriormente. Preferentemente, la secuencia de dicho dominio N-terminal está representada por la SEC ID Nº 2. Preferentemente, la secuencia de dicho dominio C-terminal está representada por la SEC ID Nº 3.

La determinación de la concentración de progastrina, en un método según la divulgación, se realiza mediante cualquier método conocido por un experto en la materia de bioquímica.

Preferentemente, determinar los niveles de progastrina en una muestra incluye poner en contacto dicha muestra con una molécula de unión a progastrina y medir la unión a progastrina de dicha molécula de unión a progastrina.

Cuando los niveles de expresión se miden a nivel de proteína, puede realizarse principalmente utilizando moléculas de unión a progastrina específicas, tales como, por ejemplo, anticuerpos, en particular utilizando tecnologías bien conocidas tales como la tinción de la membrana celular utilizando biotinilación u otras técnicas equivalentes, seguido por inmunoprecipitación con anticuerpos específicos, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA o ELISPOT, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), microalineamientos de anticuerpos o microalineamientos de tejidos acoplados a inmunohistoquímica. Otras técnicas adecuadas incluyen FRET o BRET, métodos microscópicos o histoquímicos unicelulares que utilizan una longitud de onda de excitación única o múltiple y que aplican cualquiera de los métodos ópticos adaptados, tales como métodos electroquímicos (técnicas de voltametría y amperometría), microscopía de fuerza atómica y métodos de radiofrecuencia, por ejemplo, espectroscopía de resonancia multipolar, confocal y no confocal, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de ondas de acoplador de rejilla o interferometría), ELISA celular, citometría de flujo, radioisótopos, obtención de imágenes por resonancia magnética, análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); HPLC-espectroscopía de masas; cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas (CL-EM/EM)). Todas estas técnicas se conocen bien en la materia y no es necesario detallarlas adicionalmente en la presente memoria. Estas diferentes técnicas pueden utilizarse para medir los niveles de progastrina.

Dicho método puede seleccionarse en particular de entre: un método basado en inmunodetección, un método basado en inmunotransferencia de tipo Western, un método basado en espectrometría de masas, un método basado en cromatografía y un método basado en citometría de flujo. Aunque en la divulgación se incluye cualquier medio adecuado para llevar a cabo los ensayos, métodos tales como FACS, ELISA, RIA, inmunotransferencia de tipo Western e IHC son particularmente útiles para llevar a cabo el método de la divulgación.

Más particularmente, un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago según la divulgación comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con una molécula de unión a prostaglandina utilizando un ensayo inmunoenzimático, preferentemente basado en técnicas seleccionadas de entre RIA y ELISA.

Una "muestra biológica", tal como se utiliza en la presente memoria, es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos, por ejemplo, de una proteína, un polinucleótido o transcripto de cáncer de esófago. Tal muestra debe permitir la determinación de los niveles de expresión de progastrina. Es conocido que la progastrina es una proteína secretada. Las muestras biológicas preferidas para la determinación del nivel de la proteína progastrina incluyen, por tanto, fluidos biológicos. Un "fluido biológico", tal como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier fluido que incluya material de origen biológico. Los fluidos biológicos preferidos para su utilización en la presente divulgación incluyen fluidos corporales de un animal, por ejemplo, un mamífero, preferentemente un sujeto humano. El fluido corporal puede ser cualquier fluido corporal, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, plasma, suero, linfa, líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, sudor y orina. Preferentemente, dichas muestras biológicas líquidas preferidas incluyen muestras tales como una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero. Más preferentemente, la muestra biológica es una muestra de sangre. De hecho, tal muestra de sangre puede obtenerse mediante una extracción de sangre completamente inocua del paciente y, por tanto, permite una evaluación no invasiva de los riesgos de que el sujeto desarrolle un tumor.

Una "muestra biológica", tal como se utiliza en la presente memoria, asimismo incluye una muestra de cáncer sólido del paciente que va a someterse a prueba, cuando el cáncer es un cáncer sólido. Tal muestra de cáncer sólido permite al experto realizar cualquier tipo de medición del nivel del biomarcador de la divulgación. En algunos

casos, los métodos según la divulgación pueden comprender además una etapa preliminar de extraer una muestra de cáncer sólido del paciente. Por "muestra de cáncer sólido", se hace referencia a una muestra de tejido tumoral. Incluso en un paciente con cáncer, el tejido que es el sitio del tumor todavía comprende tejido sano no tumoral. Por tanto, la "muestra de cáncer" debe limitarse al tejido tumoral extraído del paciente. Dicha "muestra de cáncer" puede ser una muestra de biopsia o una muestra extraída a partir de una terapia de resección quirúrgica.

Una muestra biológica se obtiene normalmente de un organismo eucariota, lo más preferentemente un mamífero o un ave, reptil o pez. De hecho, un "sujeto" que puede someterse al método descrito en la presente memoria puede ser cualquiera de los animales mamíferos, incluyendo ser humano, perro, gato, ganado bovino, cabra, cerdo, ganado porcino, oveja y mono; o un ave; reptil; o pez. Preferentemente, un sujeto es un ser humano; un sujeto humano puede denominarse "paciente".

Por "obtener una muestra biológica" quiere decirse en la presente memoria obtener una muestra biológica para su utilización en los métodos descritos en la presente divulgación. La mayoría de las veces, esto se hará extrayendo una muestra de células de un animal, pero asimismo puede lograrse mediante la utilización de células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o para otro fin) o realizando los métodos de la divulgación *in vivo*. Los tejidos de archivo, que presentan antecedentes de tratamiento o desenlaces, serán particularmente útiles.

Esta muestra puede obtenerse y, si es necesario, prepararse según métodos conocidos por un experto en la materia. En particular, es bien conocido en la materia que la muestra debe tomarse de un sujeto en ayunas.

La determinación de la concentración de progastrina se refiere a la determinación de la cantidad de progastrina en un volumen conocido de una muestra. La concentración de progastrina puede expresarse en relación con una muestra de referencia, por ejemplo, como una razón o un porcentaje. La concentración asimismo puede expresarse como la intensidad o localización de una señal, dependiendo del método utilizado para la determinación de dicha concentración. Preferentemente, la concentración de un compuesto en una muestra se expresa después de la normalización de la concentración total de compuestos relacionados en dicha muestra, por ejemplo, el nivel o la concentración de una proteína se expresa después de la normalización de la concentración total de proteínas en la muestra.

Preferentemente, el riesgo de que dicho sujeto padezca cáncer de esófago se determina comparando el nivel de progastrina medido en dicha muestra biológica con un nivel de referencia.

El término "nivel de referencia", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al nivel de expresión del marcador de cáncer de esófago que está considerándose, es decir, progastrina, en una muestra de referencia. Una "muestra de referencia", tal como se utiliza en la presente memoria, significa una muestra obtenida de sujetos, preferentemente dos o más sujetos, que se sabe que están libres de la enfermedad o, alternativamente, de la población general. Los niveles de expresión de progastrina de referencia adecuados pueden determinarse midiendo los niveles de expresión de dicho marcador en varios sujetos adecuados, y tales niveles de referencia pueden ajustarse a poblaciones de sujetos específicas. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que presenta un límite superior o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; una mediana de valores, un valor medio o un valor en comparación con un control o valor de referencia particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está sometiéndose a prueba, pero en un punto de tiempo anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como a partir de la población de sujetos de entre el grupo coincidente de edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que va a someterse a prueba.

Ventajosamente, un "nivel de referencia" es un nivel de progastrina predeterminado, obtenido a partir de una muestra biológica de un sujeto con un estado particular conocido con respecto al cáncer. En particular, el nivel de referencia utilizado para comparar con la muestra de prueba en la etapa (b) puede haberse obtenido a partir de una muestra biológica de un sujeto sano, o a partir de una muestra biológica de un sujeto que padece cáncer; se entiende que el perfil de expresión de referencia asimismo puede obtenerse a partir de un conjunto de muestras biológicas de sujetos sanos o a partir de un conjunto de muestras de sujetos que presentan cáncer.

En particular, en el método de la divulgación, la muestra de referencia se recoge de sujetos libres de cualquier cáncer y, preferentemente, de cualquier patología. Debe entenderse que, según la naturaleza de la muestra biológica recogida de un paciente, la muestra de referencia será una muestra biológica de la misma naturaleza que dicha muestra biológica.

El nivel de progastrina se determina en el presente método determinando la cantidad de progastrina a la que se une una molécula de unión a progastrina, preferentemente un anticuerpo que reconoce progastrina.

Por "molécula de unión a progastrina", en la presente memoria se hace referencia a cualquier molécula que se une a progastrina, pero no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly). La molécula de unión a progastrina de la presente divulgación puede

ser cualquier molécula de unión a progastrina, tal como, por ejemplo, una molécula de anticuerpo o una molécula de receptor. Preferentemente, la molécula de unión a progastrina es un anticuerpo antiprogastrina o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 5 Particularmente, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago, que comprende determinar la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto, en el que dicho sujeto muestra por lo menos un síntoma clínico de cáncer de esófago.
- 10 La presente divulgación asimismo se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago, que comprende determinar la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto, en el que dicho sujeto muestra por lo menos un síntoma clínico de cáncer y/o de metástasis.

15 Por "unión", "se une" o similar, quiere decirse que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, forma un complejo con un antígeno que, en condiciones fisiológicas, es relativamente estable. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen se conocen bien en la materia e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. En particular, dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a progastrina con una afinidad que es por lo menos dos veces mayor que su afinidad por unirse a una molécula inespecífica, tal como BSA o caseína. Más particularmente, dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une sólo a progastrina.

- 20 En particular, en un método para el diagnóstico de cáncer de esófago según la divulgación, una muestra biológica del sujeto se pone en contacto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, en el que la afinidad de dicha molécula por progastrina es de por lo menos 100 nM, por lo menos 90 nM, por lo menos 80 nM, por lo menos 70 nM, por lo menos 60 nM, por lo menos 50 nM, por lo menos 40 nM, por lo menos 30 nM, por lo menos 20 nM, por lo menos 10 nM, por lo menos 5 nM, por lo menos 100 pM, por lo menos 10 pM o por lo menos 1 pM, tal como se determina mediante un método tal como el descrito anteriormente.

- 25 En particular, la presente divulgación se refiere a un método para el diagnóstico de cáncer de esófago, que comprende detectar la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto, en el que dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo anti-hPG, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

30 El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos policlonales y monoclonales. Un anticuerpo (o "inmunoglobulina") consiste en una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región (o dominio) variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables", que son las principales responsables de la unión de un epítopo de un antígeno y que están intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). El experto conoce bien los métodos para identificar las CDR dentro de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo y determinar su secuencia. Para evitar dudas, en ausencia de cualquier indicación en el texto de lo contrario, la expresión CDR significa las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo según lo definido por IMGT, en el que la numeración única de IMGT proporciona una delimitación normalizada de las regiones de entramado y de las regiones determinantes de complementariedad, CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2.

- 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100
- La numeración única de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables cualquiera que sea el receptor de antígeno, el tipo de cadena o la especie [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre presentan la misma posición, por ejemplo, cisteína 23 (1<sup>a</sup>-CYS), triptófano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2<sup>a</sup>-CYS), fenilalanina o triptófano. 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única de IMGT proporciona una delimitación normalizada de las regiones de entramado (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Como los huecos representan posiciones desocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre corchetes y separadas por puntos, por ejemplo [8.8.13]) se convierten en información crucial. La numeración única de IMGT se utiliza en representaciones gráficas 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

- 65 Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones

variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico. Los anticuerpos pueden ser de diferentes isotipos (concretamente, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM).

Más particularmente, dicho anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos policloniales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos químéricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos camelizados, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.

Un "anticuerpo políclonal" es un anticuerpo que se produjo entre o en presencia de uno o más de otros anticuerpos no idénticos. En general, los anticuerpos polícloniales se producen a partir de un linfocito B en presencia de varios otros linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Habitualmente, los anticuerpos polícloniales se obtienen directamente de un animal inmunizado.

El término "anticuerpo monoclonal" designa un anticuerpo que surge de una población de anticuerpos casi homogénea, en la que la población comprende anticuerpos idénticos excepto por algunas posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden encontrarse en proporciones mínimas. Un anticuerpo monoclonal surge del crecimiento del clón de una sola célula, tal como un hibridoma, y se caracteriza por cadenas pesadas de una clase y subclase y cadenas ligeras de un tipo.

Por la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, pretende indicarse cualquier péptido, polipéptido o proteína que conserva la capacidad de unirse a la diana (asimismo denominada generalmente antígeno) de dicho anticuerpo, generalmente el mismo epítopo, y que comprende una secuencia de aminoácidos de por lo menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, por lo menos 175 residuos de aminoácidos contiguos o por lo menos 200 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo.

En particular, dicho fragmento de unión a antígeno comprende por lo menos una CDR del anticuerpo del que deriva. Todavía preferentemente, dicho fragmento de unión a antígeno comprende 2, 3, 4 o 5 CDR, más preferentemente las 6 CDR, del anticuerpo del que se deriva.

Los "fragmentos de unión a antígeno" pueden seleccionarse, sin limitación, de entre el grupo que consiste en Fv, scFv (sc para cadena sencilla), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', fragmentos scFv-Fc o diacuerpos, o proteínas de fusión con péptidos desordenados, tales como XTEN (polipéptido recombinante extendido) o motivos PAS, o cualquier fragmento cuyo tiempo de semivida aumentaría por modificación química, tal como la adición de polí(alquilen)glicol tal como poli(etilen)glicol ("pegilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" para poli(etilen)glicol), o por incorporación en un liposoma, presentando dichos fragmentos por lo menos una de las CDR características del anticuerpo según la divulgación. Preferentemente, dichos "fragmentos de unión a antígeno" estarán constituidos por o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del que se derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para conservar la misma especificidad de unión que el anticuerpo del que desciende y una afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, de manera más preferida por lo menos 1/10, de la afinidad del anticuerpo del que desciende, con respecto a la diana.

En particular, en un método para el diagnóstico de cáncer de esófago según la divulgación, una muestra biológica de un sujeto se pone en contacto con un anticuerpo que se une a progastrina, en el que dicho anticuerpo se ha obtenido mediante un método de inmunización conocido por un experto en la materia, en el que se utiliza como inmunógeno un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende la totalidad o una parte de la secuencia de aminoácidos de la progastrina. Más particularmente, dicho inmunógeno comprende un péptido seleccionado de entre:

- 60 • un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de la progastrina de longitud completa y, particularmente, la progastrina humana de longitud completa de SEC ID Nº 1,
- 65 • un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte de la secuencia de aminoácidos de la

progastrina y, particularmente, la progastrina humana de longitud completa de SEC ID Nº 1,

- un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte o a la secuencia de aminoácidos completa de la parte N-terminal de la progastrina y, en particular, péptidos que comprenden, o que consisten en, la secuencia de aminoácidos: SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID Nº 2), y
- un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte o a la secuencia de aminoácidos completa de la parte C-terminal de la progastrina y, en particular, péptidos que comprenden, o que consisten en, la secuencia de aminoácidos: QGPWLEEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEC ID Nº 3),
- un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte de la secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la progastrina y, en particular, péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos FGRRSAEDEN (SEC ID Nº 40) correspondiente a los aminoácidos 71-80 de la progastrina.

15 El experto apreciará que tal inmunización puede utilizarse para generar anticuerpos o bien policlonales o bien monoclonales, según se deseé. Los métodos para obtener cada uno de estos tipos de anticuerpos se conocen bien en la materia. Por tanto, el experto seleccionará e implementará fácilmente un método para generar anticuerpos policlonales y/o monoclonales contra cualquier antígeno dado.

20 Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que se generaron utilizando un inmunógeno que comprende la secuencia de aminoácidos "SWKPRSQQPDAPLG", correspondiente a la secuencia de aminoácidos 1-14 de la progastrina humana (extremo N-terminal) incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales designados como: AcM3, AcM4, AcM16 y AcM19 y AcM20, tal como se describe en la tabla 1 a la tabla 4 siguientes. Se han descrito otros anticuerpos monoclonales, aunque no está claro si estos anticuerpos se unen realmente a progastrina (documento WO 2006/032980). Los resultados experimentales del mapeo de epítopos muestran que AcM3, AcM4, AcM16 y AcM19 y AcM20 se unen específicamente a un epítopo dentro de dicha secuencia de aminoácidos N-terminal de hPG. Se han descrito en la materia anticuerpos policlonales que reconocen específicamente un epítopo dentro del extremo N-terminal de la progastrina representado por SEC ID Nº 2 (ver por ejemplo, el documento WO 2011/083088).

30

Tabla 1

Depósito de hibridomas	AcM	Secuencias de aminoácidos		SEC ID Nº
6B5B11C10	AcM3	CDR1 de VH	GYIFTSYW	SEC ID Nº 4
		CDR2 de VH	FYPGNSDS	SEC ID Nº 5
		CDR3 de VH	TRRDSPQY	SEC ID Nº 6
		CDR1 de VL	QSIVHSNGNTY	SEC ID Nº 7
		CDR2 de VL	KVS	SEC ID Nº 8
		CDR3 de VL	FQGSHVPFT	SEC ID Nº 9

Tabla 2

Depósito de hibridomas	AcM	Secuencias de aminoácidos		SEC ID Nº
20D2C3G2	AcM4	CDR1 de VH	GYTFSSW	SEC ID Nº 10
		CDR2 de VH	FLPGSGST	SEC ID Nº 11
		CDR3 de VH	ATDGNYDWFAY	SEC ID Nº 12
		CDR1 de VL	QSLVHSSGVTY	SEC ID Nº 13
		CDR2 de VL	KVS	SEC ID Nº 14
		CDR3 de VL	SQSTHVPPT	SEC ID Nº 15

Tabla 3

Depósito de hibridomas	AcM	Secuencias de aminoácidos		SEC ID Nº
1E9D9B6	AcM16	CDR1 de VH	GYTFTSYY	SEC ID Nº 16
		CDR2 de VH	INPSNGGT	SEC ID Nº 17
		CDR3 de VH	TRGGYYPFDY	SEC ID Nº 18
		CDR1 de VL	QSLLDSDGKTY	SEC ID Nº 19
		CDR2 de VL	LVS	SEC ID Nº 20
		CDR3 de VL	WQGTHSPYT	SEC ID Nº 21

40

Tabla 4

Depósito de hibridomas	AcM	Secuencias de aminoácidos		SEC ID Nº
1B3B4F11	AcM19	CDR1 de VH	GYSITSDYA	SEC ID Nº 22

Depósito de hibridomas	AcM	Secuencias de aminoácidos		SEC ID Nº
		CDR2 de VH	ISFSGYT	SEC ID Nº 23
		CDR3 de VH	AREVNYGDSYHFDY	SEC ID Nº 24
		CDR1 de VL	SQHRTYT	SEC ID Nº 25
		CDR2 de VL	VKKDGSH	SEC ID Nº 26
		CDR3 de VL	GVGDAIKGQSVFV	SEC ID Nº 27

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden generarse utilizando un inmunógeno que comprende la secuencia de aminoácidos "QGPWLEEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN" (parte C-terminal de la progastrina) correspondiente a la secuencia de aminoácidos 55-80 de la progastrina humana incluyen, pero sin limitarse a, los anticuerpos designados como: AcM8 y AcM13 en las siguientes tablas 5 y 6. Los resultados experimentales del mapeo de epítopos muestran que AcM13 se une específicamente a un epítopo dentro de dicha secuencia de aminoácidos C-terminal de hPG.

Tabla 5

10

Depósito de hibridomas	AcM	Secuencias de aminoácidos		SEC ID Nº
1C10D3B9	AcM8	CDR1 de VH	GFTFTTYA	SEC ID Nº 28
		CDR2 de VH	ISSGGTYT	SEC ID Nº 29
		CDR3 de VH	ATQGNYSLDF	SEC ID Nº 30
		CDR1 de VL	KSLRHTKGITF	SEC ID Nº 31
		CDR2 de VL	QMS	SEC ID Nº 32
		CDR3 de VL	AQNLELPLT	SEC ID Nº 33

Tabla 6

15

Otros ejemplos incluyen anticuerpos monoclonales y/o policlonales anti-hPG generados utilizando un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 40.

20

Más particularmente, en un método según la divulgación, dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo anti-hPG o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo anti-hPG se selecciona de entre anticuerpos anti-hPG N-terminal y anticuerpos anti-hPG C-terminal.

25

Los términos "anticuerpos anti-hPG N-terminal" y "anticuerpos anti-hPG C-terminal" designan anticuerpos que se unen a un epítopo que comprende aminoácidos ubicados en la parte N-terminal de hPG o a un epítopo que comprende aminoácidos ubicados en la parte C-terminal de hPG, respectivamente. Preferentemente, el término "anticuerpos anti-hPG N-terminal" se refiere a anticuerpos que se unen a un epítopo ubicado en un dominio de progastrina cuya secuencia está representada por SEC ID Nº 2. Preferentemente, el término "anticuerpos anti-hPG C-terminal" se refiere a anticuerpos que se unen a un epítopo ubicado en un dominio de progastrina cuya secuencia está representada por SEC ID Nº 3.

30

El término "epítopo" es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítopos estructurales y presentan aquellos aminoácidos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítopos asimismo pueden ser conformacionales. Los epítopos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y pueden presentar características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. La determinación del epítopo unido por un anticuerpo puede realizarse mediante cualquier técnica de mapeo de epítopos conocida por un experto en la materia. Un epítopo puede comprender diferentes aminoácidos, que se ubican secuencialmente dentro de la secuencia de aminoácidos de una proteína. Un epítopo asimismo puede comprender aminoácidos que no se ubican secuencialmente dentro de la secuencia de aminoácidos de una proteína.

En particular, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado de entre el grupo que consiste en:

45

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las

- secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 4, 5 y 6, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 7, 8 y 9, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 7, 8 y 9, respectivamente,
- 5 • un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 10, 11 y 12, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 13, 14 y 15, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 13, 14 y 15, respectivamente,
  - 10 • un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 16, 17 y 18, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 19, 20 y 21, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 19, 20 y 21, respectivamente,
  - 15 • un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 22, 23 y 24, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 25, 26 y 27, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 25, 26 y 27, respectivamente,
  - 20 • un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 28, 29 y 30, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 28, 29 y 30, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 31, 32 y 33, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 31, 32 y 33, respectivamente, y
  - 25 • un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 34, 35 y 36, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 34, 35 y 36, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 37, 38 y 39, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 37, 38 y 39, respectivamente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el “porcentaje de identidad” o “% de identidad” entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenido tras la alineación óptima, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, pudiendo realizarse dicha comparación por segmento o utilizando una “ventana de alineación”. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de por comparación manual, mediante métodos conocidos por un experto en la materia.

Para la secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos incluyen aquellos que contienen la secuencia de referencia, determinadas modificaciones, principalmente una delección, adición o

5 sustitución de por lo menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". En este caso, la expresión "aminoácidos equivalentes" pretende indicar cualquier aminoácido que sea probable que se sustituya por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, sin embargo, las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de los ejemplos 10 específicos definidos a continuación.

Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse o bien por su homología estructural con los aminoácidos por los que se sustituyen o bien por los resultados de pruebas comparativas de la actividad biológica entre los diversos 15 anticuerpos que probablemente se generen.

15 En particular, el anticuerpo utilizado en el método de la divulgación puede ser un anticuerpo humanizado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo humanizado" significa un anticuerpo que 20 contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, derivándose las otras partes de la molécula de anticuerpo de uno o varios anticuerpos humanos. Además, algunos de los residuos del segmento de la estructura principal (denominados FR para región de entramado) pueden modificarse para conservar la afinidad de unión, según técnicas conocidas por un experto en la materia (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525, 1986). El objetivo de la humanización es una reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, tal como un 25 anticuerpo murino, para su introducción en un ser humano, a la vez que se mantiene la afinidad de unión al antígeno y la especificidad del anticuerpo en su totalidad.

Los anticuerpos humanizados de la divulgación o fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante técnicas conocidas por un experto en la materia (tales como, por ejemplo, las descritas en los documentos de Singer *et al.*, *J. Immun.*, 150: 2844-2857, 1992). Tales anticuerpos humanizados se prefieren para su utilización en métodos que 30 implican diagnósticos *in vitro* o tratamientos preventivos y/o terapéuticos *in vivo*. Un experto en la materia asimismo conoce otras técnicas de humanización. De hecho, los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una variedad de técnicas, incluyendo el injerto de CDR (documentos EP 0 451 261; EP 0 682 040; EP 0 939 127; EP 0 566 647; US 5,530,101; US 6,180,370; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,639,641; US 6,054,297; US 5,886,152; y US 35 5,877,293), revestimiento o modificación de la superficie (documentos EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6): 805-814; Roguska M.A. *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. ScL U.S.A.*, 91: 969-973) e intercambio de cadenas (patente US nº 5,565,332). Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la materia, incluyendo los métodos de presentación en fagos. Véanse asimismo las patentes US nº 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806 y 5,814,318; y las publicaciones de solicitud de patente internacional nº WO 98/46645, WO 40 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

Más particularmente, dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- 45 • un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 4, 5 y 6, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por 50 lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 7, 8 y 9, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 7, 8 y 9, respectivamente,
- 55 • un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 10, 11 y 12, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias 60 de aminoácidos SEC ID Nº 13, 14 y 15, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 13, 14 y 15, respectivamente,
- 65 • un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las

- secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 16, 17 y 18, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 19, 20 y 21, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 19, 20 y 21, respectivamente,
- 5
- un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 22, 23 y 24, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 25, 26 y 27, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 25, 26 y 27, respectivamente,

10

    - un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 28, 29 y 30, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 28, 29 y 30, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 31, 32 y 33, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 31, 32 y 33, respectivamente, y

15

      - un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 34, 35 y 36, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 34, 35 y 36, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 37, 38 y 39, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nº 37, 38 y 39, respectivamente,

20

        - un anticuerpo humanizado que comprende una cadena ligera y la cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

en el que dicho anticuerpo asimismo comprende regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano.

Un método según la divulgación comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítopo de hPG, en el que dicho epítopo está ubicado dentro de la parte C-terminal de hPG, o a un epítopo ubicado dentro de la parte N-terminal de hPG.

Más específicamente, un método según la divulgación comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítopo de hPG, en el que dicho epítopo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de la progastrina seleccionada de entre una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos de 10 a 14 de hPG, los aminoácidos de 9 a 14 de hPG, los aminoácidos de 4 a 10 de hPG, los aminoácidos de 2 a 10 de hPG y los aminoácidos de 2 a 14 de hPG, en el que la secuencia de aminoácidos de hPG es SEC ID Nº 1.

Más específicamente, un método según la divulgación comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítopo de hPG, en el que dicho epítopo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la progastrina seleccionada de entre una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos de 71 a 74 de hPG, los aminoácidos de 69 a 73 de hPG, los aminoácidos de 71 a 80 de hPG (SEC ID Nº 40), los aminoácidos de 76 a 80 de hPG y los aminoácidos de 67 a 74 de hPG, en el que la secuencia de aminoácidos de hPG es SEC ID Nº 1.

Una composición según la divulgación comprende un anticuerpo que reconoce un epítopo que incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la progastrina.

Más específicamente, una composición según la divulgación comprende un anticuerpo que reconoce un epítopo de progastrina, en el que dicho epítopo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de la progastrina, en la que dicha secuencia de aminoácidos puede incluir

los residuos 10 a 14 de hPG, los residuos de 9 a 14 de hPG, los residuos de 4 a 10 de hPG, los residuos de 2 a 10 de hPG o los residuos de 2 a 14 de hPG, en la que la secuencia de aminoácidos de hPG es SEC ID Nº 1.

Más específicamente, una composición según la divulgación comprende un anticuerpo que reconoce un epítopo de progastrina, en el que dicho epítopo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la progastrina, en la que dicha secuencia de aminoácidos puede incluir los residuos de 71 a 74 de hPG, los residuos de 69 a 73 de hPG, los residuos de 71 a 80 de hPG (SEC ID Nº 40), los residuos de 76 a 80 de hPG o los residuos de 67 a 74 de hPG, en la que la secuencia de aminoácidos de hPG es SEC ID Nº 1.

En particular, dicho método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago según la divulgación comprende una etapa de poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con una primera molécula que se une a una primera parte de progastrina y con una segunda molécula que se une a una segunda parte de progastrina. Más particularmente, cuando dicha molécula de unión a progastrina es un anticuerpo, una muestra biológica de un sujeto se pone en contacto con un anticuerpo que se une a un primer epítopo de progastrina y con un segundo anticuerpo que se une a un segundo epítopo de progastrina.

Preferentemente, el método de la presente divulgación para el diagnóstico de cáncer de esófago comprende detectar progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano.

Más preferentemente, el método de la presente divulgación para el diagnóstico de cáncer de esófago comprende detectar la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano.

En particular, el método de la presente divulgación para el diagnóstico de cáncer de esófago comprende detectar la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano, en el que dicha muestra biológica se selecciona de sangre, suero y plasma.

Todavía preferentemente, el método de la presente divulgación comprende poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como el descrito anteriormente, en el que la unión de dicho anticuerpo anti-hPG en la muestra indica la presencia de cáncer de esófago en dicho sujeto.

Más particularmente, el método de la presente divulgación comprende poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como el descrito anteriormente, en el que una concentración de progastrina superior a 10 pM en dicha muestra es indicativa de la presencia de cáncer de esófago en dicho sujeto.

Más preferentemente, el método de la presente divulgación comprende poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como el descrito anteriormente, en el que una concentración de progastrina superior a 10 pM, 20 pM, 30 pM o 40 pM en dicha muestra es indicativa de la presencia de cáncer de esófago en dicho sujeto.

Todavía más preferentemente, el método de la presente divulgación comprende poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como el descrito anteriormente, en el que una concentración de progastrina superior a 10 pM, 20 pM, 30 pM, 40 pM en dicho plasma es indicativa de la presencia de cáncer de esófago metastatizado en dicho sujeto.

La presente divulgación asimismo se refiere a métodos para monitorizar la eficacia de un tratamiento para el cáncer de esófago en un paciente, tal como quimioterapia, terapia biológica, inmunoterapia o terapia con anticuerpos, determinando la concentración de progastrina en una primera muestra, tal como un fluido corporal o una biopsia de cáncer de esófago, obtenida de un paciente antes del tratamiento del cáncer de esófago, y luego comparar la concentración de progastrina en la primera muestra con la de una segunda muestra obtenida del mismo paciente después del tratamiento, en los que una reducción de la concentración de progastrina en dicha segunda muestra en comparación con dicha primera muestra indica que el tratamiento fue eficaz.

En particular, un método según la divulgación comprende comparar la concentración de progastrina en una muestra biológica obtenida de un paciente con un valor predeterminado de concentración de progastrina en la muestra, más particularmente, dicho valor predeterminado se selecciona de entre: una media o un promedio de valores de muestra basados en la determinación media o promedio del valor en una población libre de cáncer de esófago, un valor de concentración de progastrina obtenido cuando se sabía que el paciente estaba libre de cáncer de esófago.

En particular, un método según la divulgación para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago comprende determinar la concentración de progastrina en una muestra de dicho paciente y realizar una segunda prueba de diagnóstico de cáncer de esófago. Más particularmente, un método según la divulgación para el diagnóstico *in vitro* de cáncer de esófago comprende determinar la concentración de progastrina en una muestra de dicho paciente y realizar una segunda prueba de diagnóstico de cáncer de esófago, en el que

en particular, la divulgación describe un método que comprende determinar el nivel de progastrina a lo largo del tiempo en muestras de un paciente que se ha tratado o que está tratándose por cáncer de esófago.

Adicionalmente, el contenido de la presente divulgación se refiere a una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago, en la que dicha composición comprende un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Las composiciones de anticuerpos para su utilización en los métodos de la divulgación pueden prepararse como formulaciones diferentes, incluyendo, pero no sin limitarse a, una suspensión acuosa para la administración mediante una variedad de vías, incluyendo, pero sin limitarse a, administración parenteral, intratecal, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, en infusión o en bolo. En algunas formas de realización, la composición se formula para administración parenteral y, en algunas formas de realización específicas, para inyección intravenosa mediante infusión.

En una forma de realización particular, una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago, según la divulgación, comprende una dosis eficaz de los anticuerpos antiprogastrina de la invención comprendida entre 0.001 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg, que puede administrarse en una administración o en múltiples administraciones separadas.

En una forma de realización particular, una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago, según la divulgación, comprende un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, seleccionado de entre anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos químicos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos camelizados, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM. Preferentemente, dicho anticuerpo son los descritos anteriormente. Más preferentemente, dichos anticuerpos son anticuerpos humanizados.

En una forma de realización más particular, una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago, según la divulgación, comprende un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que presenta una afinidad por progastrina de por lo menos 5000 nM, por lo menos 500 nM, 100 nM, 80 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 7 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM, 0.1 nM, 50 pM, 10 pM, 5 pM, 1 pM o por lo menos 0.1 pM, tal como se determina mediante un método tal como el descrito anteriormente.

En una forma de realización incluso más particular, una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago comprende un anticuerpo de unión a progastrina, en la que dicha molécula de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, es un anticuerpo neutralizante.

La expresión "anticuerpo anti-PG neutralizante" designa un anticuerpo que se une a PG y bloquea la señalización dependiente de PG, lo que da como resultado la inhibición de las respuestas inducidas por PG en células tumorales y, particularmente, en células tumorales esofágicas. La inhibición de las respuestas inducidas por PG de las células esofágicas puede estar mediada por la represión de la diferenciación celular, la represión de la muerte celular y/o la estimulación de la proliferación celular.

En otra forma de realización particular, una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago comprende un anticuerpo de unión a progastrina, en la que dicha molécula de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, es un anticuerpo humanizado.

En una forma de realización particular, una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago comprende un anticuerpo de unión a progastrina, en la que dicha molécula de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, se conjuga con una molécula citotóxica.

En otra forma de realización particular, una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago para un paciente comprende un anticuerpo de unión a progastrina, en la que dicho paciente se ha diagnosticado con cáncer de esófago mediante un método según la presente divulgación, en la que una concentración de progastrina es mayor en una muestra biológica de dicho paciente que en una muestra de referencia.

En un aspecto más particular, la presente divulgación se refiere a una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago según la divulgación, en la que dicho anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona de entre anticuerpos antiprogastrina N-terminal y anticuerpos antiprogastrina C-terminal.

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago según la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, la composición farmacéutica para su utilización en

la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago según la divulgación comprende un anticuerpo tal como el descrito anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago según la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que dicho anticuerpo antiprogastrina se administra a una dosis de desde 0.001 mg/kg hasta 250 mg/kg, y preferentemente a una dosis de por lo menos 0.005 mg/kg, por lo menos 0.01 mg/kg, por lo menos 0.05 mg/kg, por lo menos 0.1 mg/kg, por lo menos 0.5 mg/kg, por lo menos 1 mg/kg, por lo menos 5 mg/kg, por lo menos 10 mg/kg, por lo menos 50 mg/kg o por lo menos 100 mg/kg. Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a un kit de partes que comprende una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago según la divulgación y una molécula terapéutica anticancerosa.

De hecho, el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-PG, tal como se describe en la presente memoria, puede combinarse con, o ser complementario a, otra terapia. Los ejemplos no limitativos de otra terapia incluyen tratamiento quimioterápico, radioterapia, resección quirúrgica y terapia con anticuerpos.

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a un kit de partes que comprende una composición para su utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago según la divulgación y una molécula terapéutica anticancerosa seleccionada de entre: una molécula quimioterápica, una molécula de terapia dirigida ("targeted").

En una forma de realización particular, la presente divulgación se refiere a kits de partes que comprenden, para la administración simultánea, secuencial o por separado, una composición para el tratamiento del cáncer de esófago según la divulgación y una molécula quimioterápica. Las moléculas quimioterápicas útiles para este fin incluyen, pero sin limitarse a, antagonistas de folato, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, moléculas de alquilación de ADN, fármacos de reticulación de ADN, antibióticos, complejos de platino, inhibidores del proteasoma, venenos del huso mitótico, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de tirosina cinasa y otras.

En otra forma de realización particular, la presente divulgación se refiere a kits de partes que comprenden, para la administración simultánea, secuencial o por separado, una composición según la divulgación y una composición que comprende otra molécula de terapia dirigida. Tal molécula de terapia dirigida incluye, pero sin limitarse a, anticuerpos que se dirigen a ("target") EGFR, tales como cetuximab o panitumumab, anticuerpos que se dirigen a VEGF, tales como bevacizumab, anticuerpos que se dirigen a HER2, tales como trastuzumab o pertuzumab, anticuerpos que se dirigen a PD-1 y PDL-1, tales como pembrolizumab, anticuerpos que se dirigen a CTLA-4, tales como ipilimumab, fármacos de molécula pequeña que se dirigen a EGFR, tales como erlotinib, fármacos de molécula pequeña que se dirigen a BRAF, tales como vemurafenib o dabrafenib, una proteína de fusión recombinante que se dirige a VEGF, tal como afiblertcept.

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a la utilización de un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para el diagnóstico de cáncer de esófago.

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a la utilización de un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a la utilización de un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago para un paciente, en la que se ha determinado la concentración de progastrina en una muestra biológica de dicho paciente y es mayor que la concentración de progastrina de una muestra biológica de referencia.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a la utilización de un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago para un paciente, en la que dicho paciente presenta metástasis.

Incluso más particularmente, la presente divulgación se refiere a la utilización de un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago para un paciente, en la que dicho paciente presenta metástasis y en la que se ha determinado la concentración de progastrina en una muestra biológica de dicho paciente y es mayor que la concentración de progastrina de una muestra biológica de referencia.

Los constituyentes de los que se compone la combinación pueden administrarse de manera simultánea, por separado o secuencial para obtener la máxima eficacia de la combinación; siendo posible que cada administración varíe en cuanto a su duración desde una administración rápida hasta una perfusión continua.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "administración simultánea" se refiere a la administración de los dos compuestos de la composición según una única forma farmacéutica. Tal como se utiliza en la presente memoria, "administración por separado" se refiere a la administración, al mismo tiempo, de los dos compuestos de la composición según la divulgación en distintas formas farmacéuticas. Tal como se utiliza en la presente memoria,

"administración secuencial" se refiere a la administración sucesiva de los dos compuestos de la composición según la divulgación, cada uno en una forma farmacéutica distinta.

5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la concentración o cantidad mínima de un compuesto (o de compuestos) que es eficaz para prevenir, aliviar, reducir o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del paciente que está tratándose.

### Leyendas de las figuras

10 Figura 1: concentración plasmática media de progastrina en pacientes con cáncer de esófago (n=12) y en pacientes de control (n=103) - prueba de Mann Whitney bilateral, \*\*\* p<0.001

15 Figura 2: número de esferas OE33 formadas después del tratamiento con control (CT Hz) o anticuerpo humanizado anti-PG (PG Hz) en condiciones de adherencia ultrabaja - prueba de la t bilateral, \* p <0.05.

### Ejemplos

20 **Ejemplo 1 (ejemplo ilustrativo): detección de la concentración plasmática de progastrina utilizando anticuerpos policlonales**

25 Se cuantificaron los niveles plasmáticos de progastrina mediante ELISA a través de la utilización de dos anticuerpos antiprogastrina específicos: se recubren los pocillos de la placa con anticuerpos de captura, mientras que los anticuerpos de revelación se utilizan para detectar la progastrina y mediar en la revelación de la señal.

30 En el presente ejemplo, la cuantificación se basa en el método ELISA que permite, a través de la utilización de un sustrato cuya reacción emite luz, asignar un valor proporcional a la cantidad de luminiscencia de los anticuerpos unidos al antígeno retenido por los anticuerpos de captura.

### Material

35 Los reactivos y el aparato se presentan en la tabla 7:

Tabla 7

Designación	Proveedor	Referencia
Placas Maxisorp blancas Nunc, 96 pocillos	Dutscher	n.º 055221
Carbonato/bicarbonato de sodio	Sigma	n.º 21851
DPBS 1X	Lonza	n.º P04-36500
Tween-20	Biosolve	n.º 20452335
BSA	Euromedex	n.º 04-100-810-C
Estreptavidina-HRP	Pierce (Thermo)	n.º 21130
Sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal ELISA Femto	Pierce (Thermo)	n.º 37074
Anticuerpo polyclonal antiprogastrina	Eurogentec	/

35 Los anticuerpos policlonales se obtuvieron inmunizando un conejo con progastrina N-terminal (SEC ID Nº 2) o con progastrina C-terminal correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de hPG y que presenta la secuencia FGRRSAEDEN (SEC ID Nº 40), según protocolos convencionales.

40 Las características de unión de los anticuerpos policlonales contra progastrina utilizados en este ensayo son las siguientes: ausencia de unión a G34-Gly, G34, G17-Gly, G17, unión a progastrina de longitud completa.

45 Se recubren placas de 96 pocillos preparando una disolución de carbonato - bicarbonato de sodio, 50 mM, pH 9.6 disolviendo el contenido de una cápsula en 100 ml de agua MilliQ. Se prepara una disolución de anticuerpo de captura (3 µg/ml), correspondiente a los anticuerpos policlonales obtenidos utilizando el extremo C-terminal de progastrina FGRRSAEDEN (SEC ID Nº 40) en tampón carbonato. Se añaden 100 microlitros de disolución de anticuerpos a cada pocillo y se incuba a 4°C durante 16 horas (1 noche). A continuación, se bloquean las placas eliminando la disolución de anticuerpos y se lavan 3 veces con 300 µl de PBS 1X / Tween-20 al 0.1%, luego se añaden 200 µl de tampón de bloqueo (PBS 1X / Tween 20 al 0.1% / BSA al 0.1%) por pocillo y se incuba 2 horas a 22°C. A continuación, se elimina el tampón de bloqueo, se lavan los pocillos 3 veces con 300 µl de PBS 1X / Tween-20 al 0.1%.

50 La dilución del plasma se realiza de la siguiente manera: el plasma se utiliza puro, diluido 1/2, 1/5 y 1/10. Las diluciones se preparan a partir de plasma puro en PBS 1X / Tween 20 al 0.1% / BSA al 0.1%.

55 Para la prueba de control, ELISA en presencia de una concentración conocida de progastrina, se prepara la dilución

de progastrina de la siguiente manera: disolución madre de PG recombinante (progastrina humana de longitud completa producida en *E. coli* y purificada por afinidad con glutatión-agarosa / eliminación de etiquetas (Tev) / contrapurificación mediante IMAC / diáisisis, del Institut Pasteur, París, Francia) a una concentración de 0.45 mg/ml (45 microM), por triplicado. Los intervalos de concentraciones de progastrina se prepararon de la siguiente manera:

- 5 • Disolución A: dilución previa 1/10, 2 µl de disolución madre + 18 µl del tampón
- Disolución B: dilución previa 1/100, 10 µl de A + 90 µl del tampón
- Disolución C: dilución previa 1/1000, 10 µl de B + 90 µl del tampón
- Disolución D: 500 pM, 5,55 µl de C + 494,5 µl del diluyente
- 10 • Disolución E: 250 pM, 250 µl de D + 250 µl del diluyente
- Disolución F: 100 pM, 200 µl de E + 300 µl del diluyente
- Disolución G: 50 pM, 250 µl de F + 250 µl del diluyente
- Disolución H: 25 pM, 200 µl de G + 200 µl del diluyente
- 15 • Disolución I: 10 pM, 100 µl de H + 150 µl del diluyente

El intervalo de PG recombinante es lineal y, por tanto, puede ser más o menos amplio según el anticuerpo utilizado.

Para la preparación de las muestras de prueba, se reservan aproximadamente 500 µl de cada muestra y se almacenan hasta el análisis (y confirmación, si es necesario) de los resultados. Se someten a ensayo 100 µl de cada punto del intervalo y/o plasmas puros, diluidos a 1/2, 1/5 y 1/10 e incubados durante 2 horas a 22°C en las placas.

Para la revelación de la prueba, se lavan las placas 3 veces con 300 µl de PBS 1X / Tween-20 al 0.1%. Se prepara una disolución del anticuerpo polyclonal de conejo antiprogastrina, en la que dichos anticuerpos se han obtenido utilizando la parte N-terminal de la progastrina como inmunógeno, acoplados a biotina a 0,5 µg/ml, mediante dilución en PBS 1X / Tween-20 al 0.1% / BSA al 0.1%. Se añaden 100 µl de esta disolución a cada pocillo. La incubación tiene lugar durante 1 hora a 22°C. La revelación con estreptavidina-HRP se realiza retirando el anticuerpo de detección y lavando 3 veces con 300 µl de PBS 1X / Tween 20 al 0.1%, luego preparando una disolución de estreptavidina-HRP a 20 ng/ml diluida en PBS 1X / Tween 20 al 0.1% / BSA al 0.1%, en la que se añaden 100 µl de esta disolución a cada pocillo, antes de la incubación durante 1 hora a 22°C.

La detección consiste en eliminar la estreptavidina-HRP y lavar 3 veces con 300 µl de PBS 1X / Tween 20 al 0.1%, luego añadir 100 µl de disolución de sustrato quimoluminiscente por pocillo. La disolución de sustrato se prepara mezclando volúmenes iguales de las dos disoluciones del kit SuperSignal ELISA Femto, 20 ml + 20 ml, 30 minutos antes de su utilización, y se almacena a temperatura ambiente en la oscuridad. La luminiscencia se lee después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad.

Para cada condición, la prueba se realiza por triplicado y los resultados de los intervalos se presentarán como un gráfico que muestra el cambio de luminiscencia en función de la concentración de progastrina. Para cada dilución de plasma, la concentración de progastrina se determina utilizando la ecuación de la recta de regresión lineal del intervalo correspondiente (intervalo 1/10 para una muestra diluida 1/10).

#### Métodos y resultados

La concentración plasmática media de progastrina es de 42.3 pM en pacientes que presentan cáncer de esófago (n=12), mientras que la concentración plasmática media de progastrina es de 0 pM en pacientes de control (n=103) (figura 1). Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer de esófago presentan concentraciones de progastrina más altas en su plasma en comparación con individuos de control sanos.

Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer de esófago presentan niveles de progastrina más altos en su plasma en comparación con individuos de control sanos.

#### **Ejemplo 2 (ejemplo ilustrativo): detección de la concentración de progastrina utilizando anticuerpos monoclonales antiprogastrina**

Se recubren los pocillos de placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp con un primer anticuerpo específico contra progastrina de la siguiente manera. Los anticuerpos monoclonales antiprogastrina específicos para la región carboxilo-terminal de la progastrina se diluyen a una concentración de 3 µg/ml en una disolución de tampón carbonato/bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,6 en agua MilliQ.

A continuación, se añade un total de 100 µl de la disolución de anticuerpos a cada pocillo de las placas de 96 pocillos y se incuba durante la noche a 4°C. Despues de la unión, se retira la disolución de anticuerpos de los pocillos, que se lavan entonces tres veces con 100 µl de tampón de lavado (PBS 1X / Tween-20 al 0.1%). Entonces se añade a cada pocillo un total de 100 µl de tampón de bloqueo (PBS 1X / Tween-20 al 0.1% / BSA al 0.1%) y se incuba durante 2 horas a 22°C. Luego se retira el tampón de bloqueo y se lavan los pocillos tres veces con tampón

de lavado. Entonces se añaden las muestras de plasma o suero aisladas de los pacientes a los pocillos en un volumen de 100  $\mu$ l en una serie de diluciones, normalmente diluciones 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10, y luego se incuba durante 2 horas a 22°C. Las muestras de plasma o suero se analizan por duplicado.

5 Los ensayos asimismo incluyen dos curvas de calibración. La primera curva de calibración se prepara utilizando diluciones de progastrina recombinante hasta una cantidad final de 1 ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.1 ng, 0.05 ng, 0.01 ng y 0 ng por pocillo. La segunda curva de calibración, que sirve como control negativo, se prepara a partir de suero humano negativo para progastrina diluido en tampón de bloqueo a las mismas diluciones que las muestras de prueba, es decir, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10. Alternativamente, cuando se someten a ensayo muestras de plasma, la 10 segunda curva de calibración, que sirve como control negativo, se prepara a partir de plasma humano negativo para progastrina diluido en tampón de bloqueo a las mismas diluciones que las muestras de prueba, es decir, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10.

15 Una vez completada la incubación con las muestras de plasma o suero, se retira el contenido de los pocillos y se lavan los pocillos tres veces con tampón de lavado, 100  $\mu$ l/pocillo, después de lo cual se detecta la progastrina unida al primer anticuerpo utilizando un segundo anticuerpo específico para progastrina de la siguiente manera.

20 Se diluyen anticuerpos monoclonales antiprogastrina acoplados a biotina específicos para la región amino-terminal de la progastrina en tampón de bloqueo hasta una concentración de 0,1 a 10  $\mu$ g/ml, dependiendo del anticuerpo. A continuación, se añade a cada pocillo un total de 100  $\mu$ l de la disolución de anticuerpo y se incuba durante 1 hora a 22°C.

25 Una vez completada la unión del anticuerpo secundario, se lavan las placas tres veces con tampón de lavado, 100  $\mu$ l/pocillo, después de lo cual se añaden 100  $\mu$ l de una disolución de estreptavidina-HRP (25 ng/ml en tampón de bloqueo) a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a 22°C. Una vez completada la incubación con la disolución de estreptavidina-HRP, se lavan las placas tres veces con tampón de lavado, 100  $\mu$ l/pocillo. A continuación, se añaden por pocillo 100  $\mu$ l de sustrato quimioluminiscente preparado utilizando un kit de sustrato quimioluminiscente de máxima sensibilidad Pierce SuperSignal ELISA Femto, se incuba durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad y luego se lee en un luminómetro.

30 Basándose en las lecturas del luminómetro, se utiliza análisis de regresión lineal para obtener la ecuación de las rectas correspondientes a los datos de la curva de calibración. Utilizando esta ecuación, se calcula entonces la concentración de progastrina en las diversas muestras de pacientes.

35 Se calcula la concentración plasmática media de progastrina en pacientes que presentan cáncer de esófago y se compara con la concentración plasmática media de progastrina en plasma de pacientes de control. Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer de esófago presentaban niveles elevados de progastrina en su plasma en comparación con individuos de control sanos.

#### 40 **Ejemplo 3: actividad neutralizante de anticuerpos anti-hPG en estirpes celulares cancerosas**

##### 3.1. Actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales anti-hPG

45 TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 son estirpes celulares comúnmente utilizadas para estudiar el cáncer de esófago, que producen y secretan progastrina. Se someten a prueba anticuerpos monoclonales contra PG para determinar su capacidad para inhibir la proliferación en estas estirpes celulares diferentes. La supervivencia de las células de cada estirpe celular TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 se somete a prueba utilizando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

50 Para cada experimento, se siembran 50,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contiene suero bovino fetal y se incuba durante 8 horas. Las células se privan de suero durante la noche y, a partir de las 24 horas posteriores a la siembra (tiempo "T0"), las células se tratan por sextuplicado cada 12 horas durante 48 horas, en ausencia de suero bovino fetal, con de 1 a 20  $\mu$ g/ml de anticuerpos monoclonales de control (anticuerpo monoclonal anti-puromicina) (CT AcM) o con de 1 a 20  $\mu$ g/ml de AcM anti-hPG, en el que dicho AcM es un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal o un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal.

55 Dicho AcM es un anticuerpo anti-hPG C-terminal seleccionado de entre:

- 60 • un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 28, 29 y 30 y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 31, 32 y 33,
- 65 • un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 34, 35 y 36 y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 37, 38 y 39.

o un anticuerpo anti-hPG N-terminal seleccionado de entre:

- 5 • un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 7, 8 y 9,
- 10 • un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 13, 14 y 15, respectivamente,
- 15 • un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 19, 20 y 21, respectivamente,
- 20 • un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID Nº 25, 26 y 27, respectivamente,

20 El número de células a T0 se cuenta en un pocillo de control, para cada experimento.

Especificamente, se cuenta el número de células vivas en los pocillos tratados con AcM tanto de control como anti-hPG a las 48 horas, luego se calcula la diferencia entre cada recuento celular y el recuento celular determinado a T0. El número resultante de células tratadas con AcM anti-hPG se expresa entonces como un porcentaje del número de células tratadas con AcM de control.

30 El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG reduce el número de células en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control. La significación estadística se determina utilizando un ANOVA de un factor con una prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* de Tukey: \* = p <0.05, \*\* = p <0.01 y \*\*\* = p <0.001. En cada estirpe celular, los anticuerpos anti-hPG reducen la supervivencia celular.

### 3.2. Actividad neutralizante de anticuerpos humanizados anti-hPG sobre la supervivencia celular

35 Se someten a prueba anticuerpos humanizados contra PG para determinar su capacidad para inhibir la proliferación de las estirpes celulares TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33. La supervivencia de las células de cada estirpe celular TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 se somete a prueba utilizando diferentes anticuerpos humanizados anti-hPG.

40 Para cada experimento, se siembran 50,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contiene suero bovino fetal y se incuba durante 8 horas. Las células se privan de suero durante la noche y, a partir de las 24 horas posteriores a la siembra (tiempo "T0"), las células se tratan por sextuplicado cada 12 h durante 48 horas, en ausencia de suero bovino fetal, con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpos humanizados de control (anticuerpo anti-FcG1 humano, de BioXCell) (CT Hz) o con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpo anti-hPG Hz, en el que dicho Hz es un anticuerpo humanizado anti-hPG C-terminal o un anticuerpo humanizado anti-hPG N-terminal. El número de células en T0 se cuenta en un pocillo de control, para cada experimento.

45 Especificamente, se cuenta el número de células vivas en los pocillos tratados con AcM tanto de control como anti-hPG Hz a las 48 horas, luego se calcula la diferencia entre cada recuento celular y el recuento celular determinado a T0. El número resultante de células tratadas con anticuerpo anti-hPG Hz se expresa entonces como un porcentaje del número de células tratadas con AcM de control.

50 El tratamiento con anticuerpos anti-hPG Hz reduce el número de células en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control. La significación estadística se determina utilizando un ANOVA de un factor con una prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* de Tukey: \* = p <0.05, \*\* = p <0.01 y \*\*\* = p <0.001. En cada estirpe celular, los anticuerpos anti-hPG reducen la supervivencia celular.

### 3.3. Actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre la frecuencia de células madre cancerosas

60 Se someten a prueba anticuerpos monoclonales contra PG para determinar su capacidad para reducir la frecuencia de células madre cancerosas (CSC) en las estirpes celulares TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 utilizando el ensayo de dilución limitante extrema (ELDA). La frecuencia de CSC de cada estirpe celular TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 se somete a prueba utilizando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

65

Para cada experimento, las células se siembran en placas P96 (placas de 96 pocillos) de unión ultrabaja (ULA) a concentraciones celulares fijas por pocillo utilizando un citómetro de flujo FACS Aria, y se utiliza un intervalo de concentraciones desde una hasta 500 células por pocillo. Las células se cultivan hasta 11 días en placas ULA con medio M11 (Macari *et al*, Oncogene, 2015) y se tratan cada 3 o 4 días con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpos monoclonales de control (anticuerpo monoclonal anti-puromicina) (CT AcM) o con de 1 a 20 µg/ml de AcM anti-hPG, en el que dicho AcM es un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal o un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal, tal como se describe en el ejemplo 3.1.

Específicamente, al final de la fase de incubación, se observan las placas con un microscopio de contraste de fase y se evalúa el número de pocillos positivos por concentración celular. Finalmente, se utiliza la herramienta web ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) para calcular las frecuencias de CSC de cada grupo de tratamiento y someter a prueba cualquier diferencia estadística entre los grupos (prueba de la chi-cuadrado modificada).

El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG reduce la frecuencia de CSC en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control.

#### 3.4. Actividad neutralizante de anticuerpos humanizados anti-hPG sobre la frecuencia de células madre cancerosas

##### • Ensayo de formación de esferas

Se someten a prueba anticuerpos humanizados contra PG para determinar su capacidad para reducir la frecuencia de células madre cancerosas (CSC) en las estirpes celulares FLO-1, OE19 y OE33 utilizando un ensayo de formación de esferas.

Para cada experimento, se siembran 200 células en placas de 24 pocillos de unión ultrabaja (ULA). Las células se cultivan durante hasta 10 días en placas ULA con medio M11 (Macari *et al*, Oncogene, 2015) y se tratan cada 3 o 4 días con 20 µg/ml de anticuerpos humanizados de control (anticuerpo anti-FcG1 humano, de BioXCell)(CT Hz) o con 20 µg/ml de anticuerpo anti-hPG Hz (PG Hz), en el que dicho Hz es un anticuerpo humanizado anti-hPG C-terminal o un anticuerpo humanizado anti-hPG N-terminal.

Específicamente, al final de la fase de incubación, se fotografían los pocillos a través de microscopía de campo claro, se analizan las imágenes y se cuentan las esferas con un diámetro medio superior a 25 µm.

El tratamiento con anticuerpos humanizados anti-hPG reduce la frecuencia de CSC en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control.

##### • Ensayo de dilución limitante extrema

Se someten a prueba anticuerpos humanizados contra PG para determinar su capacidad para reducir la frecuencia de células madre cancerosas (CSC) en las estirpes celulares TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 utilizando el ensayo de dilución limitante extremo (ELDA). La frecuencia de CSC de cada estirpe celular TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 se somete a prueba utilizando diferentes anticuerpos humanizados anti-hPG.

Para cada experimento, las células se siembran en placas P96 (placas de 96 pocillos) de unión ultrabaja (ULA) a concentraciones celulares fijas por pocillo utilizando un citómetro de flujo FACS Aria, y se utiliza un intervalo de concentraciones desde una hasta 500 células por pocillo. Las células se cultivan durante hasta 11 días en placas ULA con medio M11 (Macari *et al*, Oncogene, 2015) y se tratan cada 3 o 4 días con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpos humanizados de control (anticuerpo humano anti-FcG1, de BioXCell) (CT Hz) o con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpo anti-hPG Hz, en el que dicho Hz es un anticuerpo humanizado anti-hPG C-terminal o un anticuerpo humanizado anti-hPG N-terminal.

Específicamente, al final de la fase de incubación, se observan las placas con un microscopio de contraste de fase y se evalúa el número de pocillos positivos por concentración celular. Finalmente, se utiliza la herramienta web ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) para calcular las frecuencias de CSC de cada grupo de tratamiento y someter a prueba cualquier diferencia estadística entre los grupos (prueba de la chi-cuadrado modificada).

El tratamiento con anticuerpos humanizados anti-hPG reduce la frecuencia de CSC en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control.

#### 3.5. Actividad neutralizante de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre la ruta WNT/β-catenina

TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 son estirpes celulares comúnmente utilizadas para estudiar el cáncer de esófago, que producen y secretan progastrina. Se sometió a ensayo la capacidad de los anticuerpos

monoclonales contra PG para inhibir la ruta WNT/β-catenina en estas estirpes celulares diferentes utilizando la expresión de la proteína survivina, un gen bien conocido dirigido a la ruta WNT/β-catenina, como lectura. La expresión de survivina de cada estirpe celular TE-1, TE-4, TE-6 y KYSE30 se somete a prueba utilizando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

5 Para cada experimento, se siembran 50,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contiene suero bovino fetal y se incuba durante 8 horas. Las células se privan de suero durante la noche y, a partir de las 24 horas posteriores a la siembra, las células se tratan por cuadruplicado cada 12 h durante 72 horas, en ausencia de suero bovino fetal, con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpos monoclonales de control (anticuerpo monoclonal antipuromicina) (CT AcM) o con de 1 a 20 µg/ml de AcM anti-hPG, en el que dicho AcM es un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal o un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal.

10 Específicamente, después de 72 horas de tratamiento, se recogen las células y se extraen las proteínas totales utilizando tampón RIPA. Una cantidad igual de proteína de células tratadas con CT AcM o AcM anti-hPG se somete entonces a una inmunotransferencia de tipo Western utilizando anticuerpo antisurvivina (anticuerpo monoclonal, nº 2802 de Cell Signaling) y anticuerpo anti-actina como control de carga (anticuerpo monoclonal, nº A4700 de SIGMA). La cuantificación se realiza utilizando el sistema GBOX Chemi de Syngene.

15 20 El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG reduce la expresión de survivina en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control. La significación estadística se determina utilizando una prueba de la T de Student para datos independientes: \* = p<0.05, \*\* = p<0.01 y \*\*\* = p<0.001.

### 3.6. Actividad neutralizante de anticuerpos humanizados anti-hPG sobre la ruta WNT/β-catenina

25 30 Se someten a prueba anticuerpos humanizados contra PG para determinar su capacidad para inhibir la ruta WNT/β-catenina en las estirpes celulares TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 utilizando la expresión de la proteína survivina, un gen bien conocido dirigido a la ruta WNT/β-catenina, como lectura. La expresión de survivina de cada estirpe celular TE-1, TE-4, TE-6, KYSE30, FLO-1, OE19 y OE33 se somete a prueba utilizando diferentes anticuerpos humanizados anti-hPG.

35 40 Para cada experimento, se siembran 50,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contiene suero bovino fetal y se incuba durante 8 horas. Las células se privan de suero durante la noche y, a partir de las 24 horas posteriores a la siembra, las células se tratan por cuadruplicado cada 12 h durante 72 horas, en ausencia de suero bovino fetal, con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpos humanizados de control (anticuerpo anti-FcG1 humano, de BioXCell) (CT Hz) o con de 1 a 20 µg/ml de anticuerpo anti-hPG Hz, en el que dicho Hz es un anticuerpo humanizado anti-hPG C-terminal o un anticuerpo humanizado anti-hPG N-terminal.

45 50 Específicamente, después de 72 horas de tratamiento, se recogen las células y se extraen las proteínas totales utilizando tampón RIPA. Una cantidad igual de proteína de células tratadas con anticuerpo CT Hz o anti-hPG Hz se somete entonces a una inmunotransferencia de tipo Western utilizando anticuerpo antisurvivina (anticuerpo monoclonal, nº 2802 de Cell Signaling) y anticuerpo anti-actina como control de carga (anticuerpo monoclonal, nº A4700 de SIGMA). La cuantificación se realiza utilizando el sistema GBOX Chemi de Syngene.

55 El tratamiento con anticuerpos humanizados anti-hPG reduce la expresión de survivina en comparación con el tratamiento con anticuerpos de control. La significación estadística se determina utilizando la prueba de la T de Student para datos independientes: \* = p<0.05, \*\* = p<0.01 y \*\*\* = p<0.001.

### **Referencias bibliográficas**

- 50 Kaz *et al*, Cancer Letters, 28 de enero de 2014;342(2):193-9. "Epigenetic biomarkers in esophageal cancer".  
Aping Yuan *et al.*, "Immunohistochemical Examination of Gastrin, Gastrin Precursors, and Gastrin/CCK-2 Receptor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinomas" Pathology Oncology Research, vol. 14, nº 4, 26 de diciembre de 2008 (26-12-2008), páginas 449-455.



5 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Aminoácidos 55-80, extremidad C-terminal de progastrina humana  
 10 <400> 3

Gln	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Trp	Met	Asp
1				5					10				15	

Phe	Gly	Arg	Arg	Ser	Ala	Glu	Asp	Glu	Asn					
				20					25					

15 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> CDR-H1 de 6B5B11C10  
 <400> 4

Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp						
1					5								

25 <210> 5  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> CDR-H2 de 6B5B11C10  
 <400> 5

Phe	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Ser						
1					5								

35 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> CDR-H3 de 6B5B11C10  
 <400> 6

Thr	Arg	Arg	Asp	Ser	Pro	Gln	Tyr						
1					5								

45 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> CDR-L1 de 6B5B11C10

<400> 7

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr  
1 5 10

5 <210> 8  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CDR-L2 de 6B5B11C10

<400> 8

Lys Val Ser  
1

15 <210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
20 <213> Artificial

<220>  
<223> CDR-L3 de 6B5B11C10

25 <400> 9

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr  
1 5

30 <210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> CDR-H1 de 20D2C3G2

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Trp  
1 5

40 <210> 11  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> CDR-H2 de 20D2C3G2

50 <400> 11

Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr  
1 5

55 <210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

60 <220>  
<223> CDR-H3 de 20D2C3G2

5 <400> 12

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

10 <210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> CDR-L1 de 20D2C3G2

20 <400> 13

Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr  
1 5 10

25 <210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> CDR-L2 de 20D2C3G2

35 <400> 14

Lys Val Ser  
1

40 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> CDR-L3 de 20D2C3G2

50 <400> 15

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr  
1 5

55 <210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

60 <220>

<223> CDR-H1 de 1E9D9B6

50 <400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr  
1 5

55 <210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

60 <220>

<223> CDR-H2 de 1E9D9B6

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60

<400> 17

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr  
1 5

<210> 18  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-H3 de 1E9D9B6

<400> 18

15 Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 19  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-L1 de 1E9D9B6

<400> 19

20 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr  
1 5 10

30 <210> 20  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> CDR-L2 de 1E9D9B6

<400> 20

40 Leu Val Ser  
1

45 <210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> CDR-L3 de 1E9D9B6

<400> 21

55 Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr  
1 5

55 <210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

60 <220>  
<223> CDR-H1 de 1B3B4F11

ES 2 861 587 T3

<400> 22

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala  
1 5

5  
<210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CDR-H2 de 1B3B4F11

<400> 23

15 Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr  
1 5

20 <210> 24  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-H3 de 1B3B4F11

25 <400> 24

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 25  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> CDR-L1 de 1B3B4F11

<400> 25

Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr  
1 5

<210> 26  
<211> 7  
<212> PRT  
45        <213> Artificial

<220>  
<223> CDR-L2 de 1B3B4F11

50 <400> 26

Val Lys Lys Asp Gly Ser His  
1 5

55 <210> 27  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Artificial

60 <220>  
60 <223> CDR-L3 de 1B3B4F11

<400> 27

Gly Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val  
1 5 10

5  
<210> 28  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-H1 de 1C10D3B9

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala  
1 5

20 <210> 29  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-H2 de 1C10D3B9

<400> 29

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr  
1 5

30 <210> 30  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-H3 de 1C10D3B9

<400> 30

40  
<210> 31  
<211> 11  
<212> PRT  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> CDR-L 1 de 1C10D3B9

50 <400> 31

Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe  
1 5 10

55 <210> 32  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Artificial

60 <220>  
<223> CDR-L2 de 1C10D3B9

ES 2 861 587 T3

<400> 32

Gln Met Ser  
1

5 <210> 33  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> CDR-L3 de 1C10D3B9

<400> 33

15 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr  
1 5

20 <210> 34  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-H1 de 2C6C3C7

23 <400> 34

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly  
1 5

30 <210> 35  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> CDR-H2 de 2C6C3C7

<400> 35

Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr  
1 5

45 <210> 36  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> CDR-H3 de 2C6C3C7

50 <400> 36

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr  
1 5

55 <210> 37  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial

60 <220>  
<223> CDR-L1 de 2C6C3C7

5 <400> 37

	Gln	Ser	Leu	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr
1						5				10	

10 <210> 38  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> CDR-L2 de 2C6C3C7

20 <400> 38

	Leu	Val	Ser
1			

25 <210> 39  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> CDR-L3 de 2C6C3C7

35 <400> 39

	Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Gln	Thr
1						5			

40 <210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Aminoácidos 71-80 de progastrina

45 <400> 40

	Phe	Gly	Arg	Arg	Ser	Ala	Glu	Asp	Glu	Asn
1						5				10

## REIVINDICACIONES

1. Composición para la utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago, en la que dicha composición comprende un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 5 2. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo de unión a progastrina, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona de entre anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos camelizados, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.
- 10 3. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho anticuerpo de unión a progastrina, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a la progastrina pero no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly).
- 15 4. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho anticuerpo de unión a progastrina es un anticuerpo monoclonal.
- 20 5. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona de entre anticuerpos antiprogastrina N-terminal y anticuerpos antiprogastrina C-terminal.
- 25 6. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo neutralizante.
- 30 7. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho anticuerpo de unión a progastrina es un anticuerpo humanizado seleccionado de entre:
  - un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, 8 y 9, respectivamente,
- 35 8. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, 14 y 15, respectivamente,
- 40 9. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 19, 20 y 21, respectivamente,
- 45 10. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 25, 26 y 27, respectivamente,
- 50 11. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 28, 29 y 30, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 31, 32 y 33, respectivamente,
- 55 12. un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 34, 35 y 36, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 37, 38 y 39, respectivamente.
- 60 13. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho anticuerpo de
- 65 14. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho anticuerpo de

unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se conjuga con una molécula citotóxica.

9. Composición para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho cáncer de esófago es metastásico.

5 10. Composición farmacéutica para la utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago, en la que dicha composición farmacéutica comprende un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 11. Kit de partes para la utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer de esófago, comprendiendo dicho kit de partes una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una molécula terapéutica anticancerosa seleccionada de entre una molécula quimioterápica y una molécula de terapia dirigida.

15 12. Kit de partes para la utilización según la reivindicación 11, en el que dicha composición y dicha molécula terapéutica anticancerosa se administran de manera simultánea, secuencial o por separado.

20 13. Kit de partes para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, en el que dicha molécula quimioterápica se selecciona de entre antagonistas de folato, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, moléculas de alquilación de ADN, fármacos de reticulación de ADN, antibióticos, complejos de platino, inhibidores de proteasoma, venenos del huso mitótico, inhibidores de topoisomerasa e inhibidores de tirosina cinasa.

25 14. Kit de partes para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha molécula de terapia dirigida se selecciona de entre anticuerpos que se dirigen a EGFR, tales como cetuximab o panitumumab, anticuerpos que se dirigen a VEGF, tales como bevacizumab, anticuerpos que se dirigen a HER2, tales como trastuzumab o pertuzumab, anticuerpos que se dirigen a PD-1 y PDL-1, tales como pembrolizumab, anticuerpos que se dirigen a CTLA-4, tales como ipilimumab, fármacos de molécula pequeña que se dirigen a EGFR, tales como erlotinib, fármacos de molécula pequeña que se dirigen a BRAF, tales como vemurafenib o dabrafenib, y una proteína de fusión recombinante que se dirige a VEGF, tal como afiblivercept.

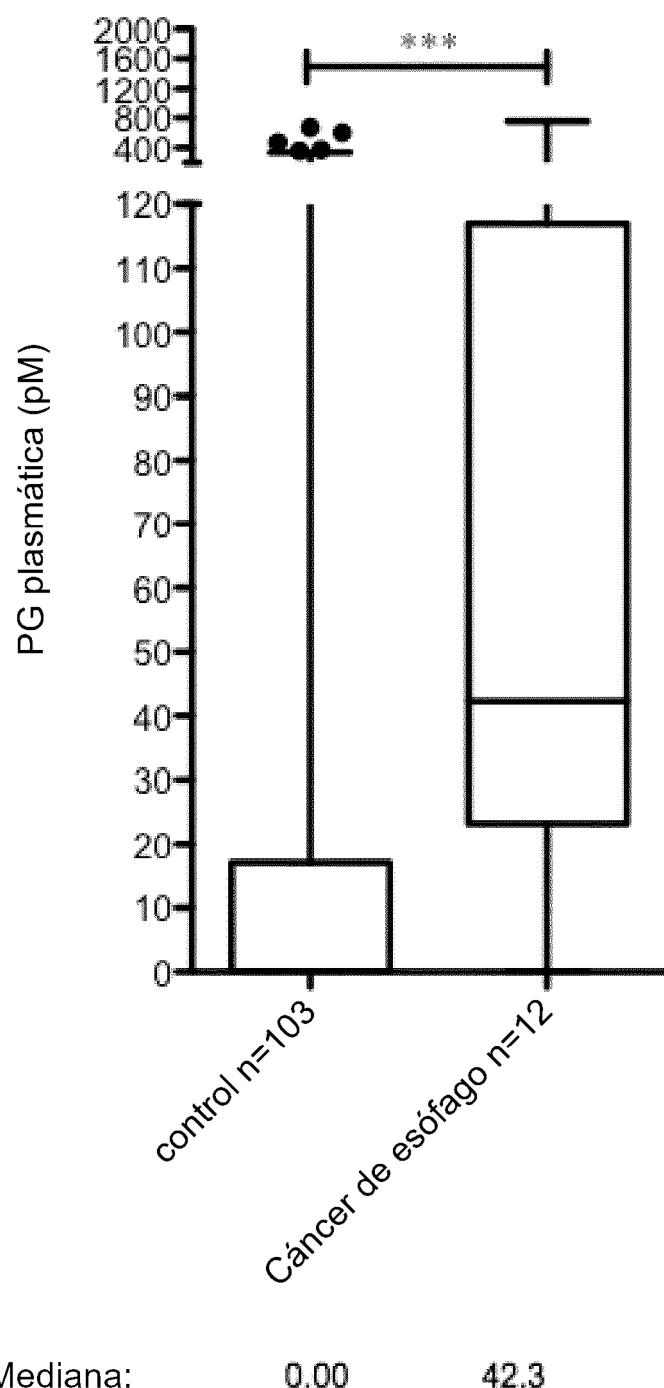


FIGURA 1

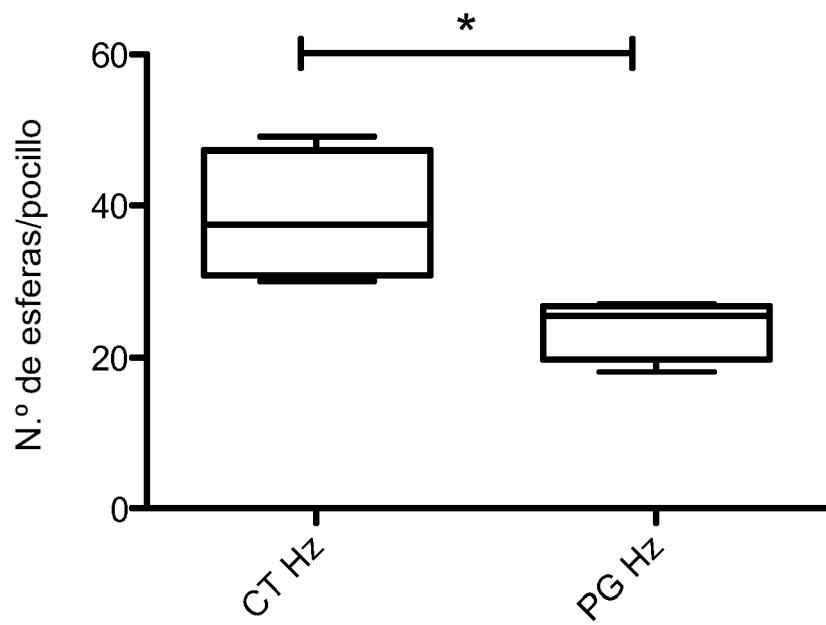


FIGURA 2