



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 801**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07789322 .0**

96 Fecha de presentación : **28.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2054443**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54

Título: **Anticuerpos contra un epítopo de AGR2, ensayos e hibridomas.**

30

Prioridad: **26.08.2006 GB 0616929**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.02.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.02.2011

73

Titular/es: **The University of Liverpool
The Foundation Building
765 Brownlow Hill Liverpool L6, GB**

72

Inventor/es: **Rudland, Philip;
Barraclough, Roger y
Barraclough, Dong, Liu**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 351 801 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

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y a fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos monoclonales. La invención también se refiere a hibridomas capaces de producir dichos anticuerpos. Otros aspectos de la invención también se refieren a
5 usos de los anticuerpos monoclonales descritos en ensayos de diagnóstico y pronóstico para la enfermedad metastásica.

La proteína 2 de gradiente anterior (AGR2) es el homólogo humano del gen específico de glándula de cemento de *Xenopus* (XAG-2). La secuencia de aminoácidos de AGR2 se muestra en la Secuencia ID N°: 1. Se ha mostrado que una expresión aumentada de AGR2 se
10 correlaciona con la positividad para receptores de estrógenos (ER) en muestras de carcinoma de mama. La expresión inducida de AGR2 parece provocar un fenotipo metastásico en células no metastásicas por lo demás benignas.

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en el mundo occidental y es la causa principal de muerte entre las personas de menos de 85 años de edad. Una de cada
15 cuatro personas de la población morirá de cáncer, y estas muertes generalmente se producen como resultado de la enfermedad metastásica intratable. La diseminación de metástasis por todo el cuerpo aumenta el número de tejidos dañados por cáncer, mientras que simultáneamente hace que el tratamiento del cáncer sea cada vez más difícil. El número de metástasis que pueden desarrollarse a partir de un solo tumor primario generalmente será
20 demasiado grande para tratarse, y el número de sitios diferentes que requieren tratamiento demasiado numeroso y variado.

La capacidad de los cánceres metastásicos de “reaparecer” o “aparecer”, incluso después de la escisión o resolución de un tumor primario y un tratamiento sistémico, contribuye en gran medida a las dificultades experimentadas en el tratamiento del cáncer y también a la
25 angustia sufrida por los pacientes con cáncer que no están seguros de si el tratamiento ha sido eficaz o no para liberarlos del cáncer.

A la luz de la grave influencia del cáncer en la población como conjunto, se apreciará que existe una necesidad bien reconocida de procedimientos que puedan usarse para diagnosticar el cáncer metastásico (enfermedad metastásica). Muchos procedimientos
30 existentes carecen de sensibilidad y/o fiabilidad y, por lo tanto, los resultados de estos procedimientos no pueden considerarse concluyentes. Una sensibilidad reducida de ensayos de diagnóstico puede llevar a diagnósticos incorrectos que se hacen basándose en resultados de ensayo incorrectos.

También existe la necesidad de ensayos que puedan usarse como pronóstico para
35 evaluar la probabilidad de un paciente de desarrollar cáncer metastásico. Las limitaciones de

sensibilidad y fiabilidad de los ensayos existentes para la enfermedad metastásica también significan que ciertos pacientes con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad metastásica no se identifican necesariamente usando los ensayos existentes. La incapacidad de identificar a dichos pacientes puede significar que se pierden las oportunidades de intervención terapéutica antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad metastásica.

También existe la necesidad de ensayos de pronóstico que puedan indicar si un paciente responderá o no de forma favorable al tratamiento para un cáncer metastásico. En general, los tratamientos para el cáncer metastásico comprenden regímenes relativamente “severos”. Dichos regímenes de tratamiento, y los efectos adversos que pueden producir, generalmente se justifican en el caso de pacientes que es de esperar que no respondan a un tratamiento menos riguroso. Sin embargo, generalmente se preferirá evitar someter a los pacientes con probabilidad de responder favorablemente a un tratamiento más “suave” a regímenes severos innecesarios. Fletcher y col. (2003) desvela un anticuerpo policlonal contra una combinación de dos péptidos que representan dos fragmentos adyacentes de hAG-2 con una homología mínima a otros miembros de la familia conocidos.

Es un objeto de ciertas realizaciones de la invención solucionar o aliviar los problemas asociados con la técnica anterior. Por ejemplo, es un objeto de ciertas realizaciones de la presente invención proporcionar ensayos de diagnóstico para la enfermedad metastásica que sean más sensibles que los proporcionados por la técnica anterior. Es un objeto de ciertas realizaciones de la presente invención proporcionar ensayos de diagnóstico para la enfermedad metastásica que sean más fiables que los proporcionados por la técnica anterior. Es un objeto de ciertas realizaciones de la invención proporcionar ensayos de diagnóstico para la enfermedad metastásica que sean más sensibles que los proporcionados por la técnica anterior. Es un objeto de ciertas realizaciones de la invención proporcionar ensayos de pronóstico para la enfermedad metastásica que sean más fiables que los proporcionados por la técnica anterior. Es un objeto de ciertas realizaciones de la invención proporcionar agentes que puedan usarse en ensayo de diagnóstico y/o pronóstico para la enfermedad metastásica que tengan mayor sensibilidad y/o fiabilidad que los proporcionados por la técnica anterior.

En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) de AGR2.

La secuencia ID N°: 2 corresponde a los 26-40 restos aminoacídicos de AGR2 humana. Los inventores han descubierto que un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene la especificidad definida anteriormente proporciona notables ventajas en su uso en comparación con anticuerpos de la técnica anterior contra AGR2. En

particular, los anticuerpos de la invención pueden usarse en ensayos de pronóstico o diagnóstico para el cáncer y, particularmente, para la enfermedad metastásica, que tienen mayor sensibilidad que ensayos similares proporcionados por la técnica anterior. Aunque la expresión de AGR2 está fuertemente asociada con cánceres mamarios, la expresión de este marcador también está presente en una amplia serie de cánceres que incluyen carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma pancreático y carcinomas de próstata. Por consiguiente, los inventores creen que los anticuerpos y procedimientos de la invención pueden usarse en relación con el cáncer, y la enfermedad metastásica, asociados con cualquier forma de cáncer primario.

10 Los “anticuerpos de la invención”, como se menciona en la presente divulgación, pueden ser cualquier anticuerpo monoclonal que tenga especificidad por un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) de AGR2. El anticuerpo producido por el hibridoma PZ7A10F10 representa un ejemplo particularmente preferido de un anticuerpo de la invención. PZ7A10F10 se depositó a tenor del Tratado de Budapest en la Colección
15 Europea de Cultivos Celulares (ECACC), en Porton Down, Salisbury, el 22 de agosto de 2006, y se le dio el Número de Registro 06082201. El anticuerpo monoclonal producido por este hibridoma, para los fines de la presente divulgación, puede denominarse “anti-AGR2/PZ7A10F10”. Anti-AGR2/PZ7A10F10, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, representa un anticuerpo preferido, o fragmentos de unión a antígeno preferidos, para su uso
20 en todos los aspectos y realizaciones de la invención. AGR2/PZ7A10F10 es una IgG, anticuerpo de cadena ligera κ .

Como se usa en la presente divulgación, debe considerarse que el término anticuerpo de la invención, a menos que el contexto exija otra cosa, comprende fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos de la invención, así como derivados de unión a antígeno de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

Cualquier fragmento de unión a antígeno adecuado de los anticuerpos de la invención puede prepararse de acuerdo con técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los fragmentos de unión a antígeno funcionales más pequeños de los anticuerpos de la invención pueden comprender las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de dichos anticuerpos. Estos fragmentos pueden tener un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o menos de un décimo el tamaño típico de un anticuerpo completo.

Pueden expresarse bien fragmentos de unión a antígeno de este tipo en sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamífero. Dichos fragmentos también pueden ser resistentes a otras condiciones perjudiciales en otros casos, tales como liofilización o
35 desnaturalización térmica.

Los anticuerpos de la invención pueden tener dominios tanto Variables como Constantes. Se apreciará que también se incluyen en la presente invención fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos scFV) que comprenden esencialmente la región Variable de un anticuerpo sin ninguna región Constante.

5 Los anticuerpos de la invención pueden “humanizarse” usando técnicas que serán bien conocidas para los expertos en la materia. La humanización puede conseguirse al menos parcialmente obteniendo por ingeniería genética anticuerpos que usan secuencias de la región V procedentes de mAb no humanos (por ejemplo, de roedor) y secuencias de región C (e idealmente FR de región V) de anticuerpos humanos. Los mAb “obtenidos por ingeniería genética” resultantes son menos inmunogénicos en seres humanos que los mAb de roedor a partir de los cuales se obtuvieron y de esta forma están más adecuados para el uso clínico, y por lo tanto son más susceptibles de uso en ensayos *in vivo*.

10 La humanización adicional de anticuerpos puede implicar el injerto de CDR o remodelación de anticuerpos. Dichos anticuerpos se producen trasplantando las CDR de cadena pesada y ligera de un mAb de roedor (que forma el sitio de unión a antígeno del anticuerpo) en las regiones flanqueantes correspondientes de un anticuerpo humano.

15 Se apreciará que, al menos en alguna medida, la mayor sensibilidad de los anticuerpos monoclonales de la invención surge como resultado de la especificidad de su unión a AGR2. Por consiguiente, puede preferirse que los anticuerpos monoclonales de la invención se unan específicamente a AGR2, pero no a proteínas similares o relacionadas. Puede preferirse particularmente que un anticuerpo monoclonal de la invención sea uno que no se une a la proteína 3 de gradiente anterior (AGR3). De hecho, esta característica es tan ventajosa que la invención también proporciona un anticuerpo monoclonal que tiene especificidad por AGR2, mientras que no tiene especificidad por AGR3.

20 Los anticuerpos de la invención son particularmente adecuados para su uso en aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico. Por consiguiente, en un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer, y particularmente enfermedad metastásica, usando un anticuerpo de la invención. En un cuarto aspecto, la invención proporciona un procedimiento para evaluar la probabilidad de desarrollar cáncer, y particularmente enfermedad metastásica, usando un anticuerpo de la invención. Para los fines de la presente divulgación, debe considerarse que un “procedimiento de la invención” incluye cualquier uso de diagnóstico o pronóstico de los anticuerpos de la invención. A menos que el contexto requiera otra cosa, cualquier procedimiento de la invención puede ponerse en práctica usando cualquier anticuerpo de la invención.

25 El uso de diagnóstico de los anticuerpos de la invención es particularmente beneficioso

ya que la sensibilidad de diagnóstico de los ensayos que usan los anticuerpos de la invención es mucho mayor que la que se podría conseguir usando procedimientos de la técnica anterior. Aunque sin desear quedar ligado a ninguna hipótesis, los inventores creen que esta mayor sensibilidad de los ensayos de diagnóstico puede proceder de la mayor sensibilidad de los anticuerpos de la invención.

Los inventores han descubierto que los anticuerpos de la invención pueden usarse en ensayos de pronóstico o diagnóstico en los que se evalúa la capacidad de los anticuerpos de la invención de unirse a células tumorales presentes en una muestra de un paciente. Los inventores han descubierto que cualquier unión de anticuerpos de la invención a células tumorales presentes en una muestra de un paciente puede considerarse indicativa, desde el punto de vista del pronóstico o diagnóstico, de enfermedad metastásica. En particular, la unión de anticuerpos de la invención a aproximadamente un 1% o más de las células tumorales presentes en una muestra de un paciente es altamente predictiva y/o diagnóstica de la enfermedad metastásica.

Por consiguiente, un ensayo de acuerdo con el tercer o cuarto aspectos de la invención puede comprender poner en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la invención; y ensayar la unión del anticuerpo a la muestra del paciente, en el que la unión del anticuerpo a la muestra del paciente es diagnóstica y/o predictiva de cáncer, y particularmente de enfermedad metastásica, en el paciente. Preferentemente, la muestra del paciente puede ser una muestra que contiene células tumorales. En este caso, puede evaluarse la unión del anticuerpo de la invención (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) a las células tumorales. En caso de que el anticuerpo de la invención se una a células tumorales presentes en la muestra del paciente, esto sirve particularmente como diagnóstico y/o pronóstico de enfermedad metastásica en el paciente.

Puede hacerse una evaluación en cuanto a la proporción de células tumorales en una muestra del paciente a las que se une un anticuerpo de la invención (o fragmento de unión a antígeno del mismo). Por ejemplo, puede indicarse un resultado de pronóstico y/o diagnóstico indicativo de enfermedad metastásica en el paciente por unión del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) al 1% o más de las células tumorales presentes en la muestra del paciente.

Las mayores incidencias de unión de los anticuerpos de la invención a células tumorales en una muestra de un paciente están asociadas con una reducción en la esperanza de vida del paciente del que se obtuvo la muestra. En caso de que un anticuerpo de la invención se una a aproximadamente un 5% o más de las células tumorales en la muestra de

un paciente, esto puede indicar que el paciente se beneficiaría de una rápida intervención para intentar tratar el cáncer y la posible metástasis. Los ensayos de este tipo también pueden usarse para determinar regímenes terapéuticos adecuados para el tratamiento de cánceres, representando los que tienen una unión relativamente alta de los anticuerpos de la invención (a

5 aproximadamente un 5% o más de las células tumorales presentes en una muestra de un paciente) candidatos adecuados para el tratamiento con regímenes que pueden ser relativamente severos si dichos regímenes proporcionaran rápidamente efectos beneficiosos.

Los ensayos de diagnóstico de la invención pueden usarse de forma beneficiosa para identificar individuos que padecen cáncer, y particularmente enfermedad metastásica. Los

10 ensayos de diagnóstico de acuerdo con el tercer aspecto de la invención pueden comprender poner en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo de la invención, y ensayar la unión del anticuerpo a la muestra del paciente, en los que la unión del anticuerpo a la muestra del paciente es predictiva de cáncer, y en particular de enfermedad metastásica, en el paciente. La unión del anticuerpo a la muestra del paciente puede ensayarse por cualquier

15 técnica relevante conocida por los expertos en la materia, y puede seleccionarse una técnica adecuada por la persona experta con referencia a la naturaleza de cualquier resto indicador que pueda unirse al anticuerpo marcado. Los restos indicadores adecuados que pueden usarse como marcadores unidos a los anticuerpos de la invención se consideran en otras partes de la memoria descriptiva.

Se apreciará que la mayor sensibilidad de los ensayos de diagnóstico desvelados en el presente documento tiene varias ventajas. La más importante de estas ventajas es que los ensayos de diagnóstico de la invención pueden permitir al usuario más confianza en el resultado de diagnóstico que en los resultados proporcionados por los ensayos de la técnica anterior. La mayor sensibilidad de los ensayos de la invención permite la detección de AGR2

25 en muestras de pacientes a menores niveles que los necesarios previamente. Esto permite un diagnóstico de cáncer más temprano, y particularmente de enfermedad metastásica, que el que se podía conseguir usando los procedimientos de la técnica anterior, y por lo tanto permite que el tratamiento empiece antes después del inicio de la enfermedad. Empezar el tratamiento antes es importante para conseguir una eficacia terapéutica máxima, y de esta forma para

30 aumentar la probabilidad de supervivencia de los pacientes.

La detección de diagnóstico de AGR2 usando los ensayos de la invención también permite la selección de regímenes terapéuticos apropiados para el tratamiento del cáncer, y particularmente de la enfermedad metastásica, que padece el paciente. En particular, los descubrimientos de los inventores sugieren que los pacientes en los que el cáncer

35 (particularmente la enfermedad metastásica) produce expresión de AGR2 pueden tener una

supervivencia significativamente más corta que pacientes equivalentes que no expresan AGR2. Este efecto parece particularmente perceptible en el caso de pacientes tratados con tamoxifeno positivos para receptores de estrógenos (ER⁺). Este descubrimiento indica que la expresión de AGR2, que puede determinarse con mayor certeza y sensibilidad usando los
5 ensayos de la invención, es indicativa de una forma de enfermedad metastásica que aparentemente es menos severa y se caracteriza por ER⁺ que no responden bien a la terapia hormonal. Por consiguiente, el diagnóstico usando los ensayos de la invención puede llevar a un médico con responsabilidad a que el paciente diagnosticado evite la terapia hormonal, y en su lugar elija terapias alternativas que probablemente tendrán resultados más beneficiosos.

10 Finalmente, la mayor sensibilidad conferida por los ensayos de la invención significa que un descubrimiento de que no se está expresando AGR2 puede aceptarse con mayor seguridad como prueba de la ausencia de enfermedad metastásica. De esta manera, los pacientes que reciben un diagnóstico de que no está presente la enfermedad metastásica (o ya no está presente después de una intervención terapéutica satisfactoria) pueden tener mayor
15 seguridad de que este descubrimiento efectivamente es correcto.

Además de los usos de diagnóstico presentados anteriormente, los anticuerpos monoclonales de la invención también son susceptibles de usarse en ensayos de pronóstico que pueden usarse para evaluar el riesgo de un paciente de tener resultados clínicos adversos debido al desarrollo de cáncer, y particularmente de cáncer metastásico. Un estudio de Innes y
20 col. (2006) indica que los pacientes ER⁺ que presentan expresión de AGR2 tienden a tener una supervivencia reducida en comparación con pacientes similares en los que está ausente AGR2. Dicho estudio desvela un anticuerpo policlonal específico para AGR2 y no para AGR3.

En particular, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse en ensayos de pronóstico que proporcionan una indicación en cuanto a cómo un paciente con cáncer, y
25 particularmente con cáncer metastásico, responderá al tratamiento de la enfermedad. Los ensayos de pronóstico de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención pueden comprender poner en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo de la invención y ensayar la unión del anticuerpo a la muestra del paciente, en los que la unión del anticuerpo a la muestra del paciente indica que el paciente tiene poca probabilidad de responder favorablemente al
30 tratamiento de la enfermedad metastásica. Dichos pacientes pueden beneficiarse del tratamiento usando regímenes terapéuticos rigurosos. Los detalles de regímenes de tratamiento rigurosos adecuados que pueden usarse para tratar el cáncer metastásico pueden determinarse con referencia a los tejidos u órganos específicos afectados por la enfermedad metastásica. Los criterios apropiados para la selección de regímenes adecuados serán
35 evidentes para un experto en la materia y, por ejemplo, pueden seleccionarse por un médico

responsable del paciente.

Los inventores creen que los ensayos de la invención pueden usarse para realizar pronósticos ya que puede producirse una expresión detectable de AGR2 antes del desarrollo de un cáncer clínicamente detectable, y particularmente de una enfermedad metastásica.

5 Además, los inventores creen que la expresión de AGR2 por metástasis podría afectar al comportamiento o desarrollo de la metástasis. Además, AGR2 puede ser detectable en muestras de pacientes antes del desarrollo de cáncer clínicamente reconocible, y particularmente de enfermedad metastásica. De esta manera, los ensayos de pronóstico de la invención pueden permitir la identificación de la presencia de AGR2 y, por lo tanto, de que un
10 paciente tenga mayor probabilidad de tener una menor supervivencia como resultado del cáncer o enfermedad metastásica. El reconocimiento de la mayor probabilidad de un paciente de tener una menor supervivencia debido a una enfermedad metastásica puede permitir la intervención profiláctica (para prevenir el desarrollo adicional de la enfermedad) y/o una mayor supervisión del desarrollo de la enfermedad metastásica para permitir que el tratamiento se
15 inicie pronto después del inicio de la enfermedad.

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención pueden usarse en ensayos de pronóstico o ensayos de diagnóstico como se describe en otras partes en la memoria descriptiva. Los inventores creen que los ensayos que usan los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse, en particular, en la evaluación de diagnóstico o
20 pronóstico de cánceres seleccionados del grupo que consiste en: cáncer de próstata; cáncer de ovario; y cáncer pancreático. Puede preferirse que las evaluaciones de estos cánceres seleccionados se realicen usando ensayos de la invención, como se describe en otras partes en la memoria descriptiva.

Los inventores han descubierto que, sorprendentemente, los anticuerpos monoclonales de la invención también pueden usarse en el pronóstico o diagnóstico de enfermedades
25 distintas de cáncer. En particular, los inventores creen que los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse para la evaluación de pronóstico o diagnóstico de enfermedades inflamatorias. La artritis reumatoide representa un ejemplo particularmente preferido de dicha enfermedad inflamatoria que puede evaluarse desde el punto de vista del pronóstico o diagnóstico usando anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención.
30

Un ensayo de pronóstico o diagnóstico para una enfermedad inflamatoria puede comprender obtener una muestra de un paciente; poner en contacto la muestra del paciente con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°:
35 2); y ensayar la unión del anticuerpo a la muestra del paciente, en el que la unión del

anticuerpo a la muestra del paciente es predictiva o diagnóstica de una enfermedad inflamatoria en el paciente.

En los ensayos de pronóstico o diagnóstico de la invención (ya sea en relación con cáncer y enfermedad metastásica o con enfermedades inflamatorias) puede usarse cualquier muestra del paciente que pueda contener proteína AGR2. Éstas pueden incluir muestras esencialmente acelulares, tales como orina, líquido cefalorraquídeo o linfa, en las que puede haberse desprendido AGR2. Preferentemente, una muestra adecuada puede ser una muestra que comprende células capaces de expresar AGR2. Los ejemplos de dichas muestras incluyen muestras de sangre o muestras (tales como muestras de biopsia) tomadas de otros tejidos. Los inventores han descubierto que pueden tener un uso particular en los ensayos de pronóstico o diagnóstico de la invención muestras histológicas o muestras de criotomía.

Los anticuerpos y ensayos de la invención pueden usarse para pronóstico o diagnóstico en relación con muchas formas de cáncer. Las formas particulares de cáncer que pueden investigarse ventajosamente usando los anticuerpos o ensayos de la invención incluyen cáncer metastásico; cáncer de próstata; cáncer de ovario; y cáncer pancreático; cáncer de mama; cáncer de estómago; cáncer esofágico; y cáncer de colon. Se apreciará que el uso de diagnóstico de los anticuerpos y ensayos de la invención puede ser particularmente útil en el caso de cánceres que pueden ser difíciles de diagnosticar de otra manera, incluyendo cánceres en sitios corporales "interiores" (es decir, no palpables desde el exterior del cuerpo), tales como cáncer pancreático o cáncer de ovario; cánceres que de otra manera pueden permanecer "sin síntomas" durante periodos prolongados, tales como cáncer de estómago; o cánceres en los que AGR2 parece expresarse en gran medida; tales como cánceres de colon.

En general, se preferiría que los ensayos de la invención, ya sean de pronóstico o diagnóstico, se usen en relación con muestras de pacientes humanos.

Los ensayos de la invención pueden utilizar cualquier medio adecuado para detectar la unión de un anticuerpo a su antígeno, conocido por los expertos en la materia. Los procedimientos adecuados pueden seleccionarse con referencia a la naturaleza de cualquier resto indicador usado para marcar los anticuerpos de la invención. Las técnicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, citometría de flujo (tal como citometría de flujo activada por fluorescencia – FACS) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), y ensayos que utilizan nanopartículas. Se prefiere particularmente que un ensayo de la invención sea uno que implica inmunocitoquímica en la que se exponen células tumorales a un anticuerpo de la invención, y se evalúa el nivel de marcaje celular. El mayor marcaje celular generalmente será indicativo de un mal resultado clínico. Pueden realizarse análisis estadísticos adecuados de los resultados de dichos ensayos de acuerdo con los ensayos indicados en el Ejemplo 2 de la

sección de Resultados Experimentales.

La invención también proporciona, en un quinto aspecto, un hibridoma capaz de producir un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) de AGR2.

Un "hibridoma de la invención" puede ser cualquier hibridoma producido de acuerdo con los procedimientos de la invención. Preferentemente, un hibridoma de la invención será un hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal de la invención. El hibridoma depositado como PZ7A10F10 con el Número de registro 06082201 representa un ejemplo particularmente preferido de un hibridoma de la invención.

Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la invención puede prepararse por aplicación de un procedimiento de inmunización rutinario usando el fragmento peptídico KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) de AGR2 como antígeno de sensibilización, seguido de un procedimiento de fusión celular usando una técnica de fusión celular rutinaria, y un procedimiento de clonación usando una técnica de clonación rutinaria.

En un ejemplo adecuado, el animal a inmunizar puede ser un animal no humano tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, cerdo, oveja, cabra o pollo. Preferentemente, el animal a inmunizar es un ratón o rata y más preferentemente un ratón. El hecho de que las células de mieloma usadas como células homólogas para una fusión celular generalmente procedan de ratón, puede hacer que sea particularmente preferible inmunizar ratones cuando se selecciona la fuente de células productoras de anticuerpo. El fragmento peptídico KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2), que corresponde a los restos aminoacídicos 26 a 40 de AGR2 de longitud completa, se usa como antígeno de sensibilización. Este antígeno puede administrarse por cualquier vía adecuada (por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea o en la almohadilla plantar) para generar una respuesta inmune en el animal inmunizado. Preferentemente, el antígeno de inmunización puede administrarse por inyección subcutánea.

El experto de la materia apreciará que pueden generarse anticuerpos de la invención usando fragmentos de AGR2 que comprenden la secuencia ID N°: 2 (incluyendo AGR2 de longitud completa) como inmunógeno, seguido de la selección de hibridomas que producen un anticuerpo que se une a un epítipo KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2).

Pueden generarse anticuerpos de la invención usando AGR2 de especies distintas de seres humanos (o secuencias correspondientes de proteínas equivalentes de especies distintas de seres humanos) siempre que se produzcan anticuerpos que tienen la especificidad de unión requerida.

La inmunización para producir anticuerpos de la invención puede realizarse usando

cualquier procedimiento adecuado conocido para un experto en la materia. Por ejemplo, un procedimiento adecuado puede comprender administrar una dosis adecuada de KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N^o: 2) diluida y suspendida en un vehículo tal como solución salina tamponada con fosfato, solución salina fisiológica o similar, a animales receptores en una base semanal durante uno a tres meses.

Una vez que se ha completado un régimen de inmunización adecuado, pueden recogerse células de bazo, linfocitos, células de sangre periférica u otras células productoras de anticuerpo de los animales inmunizados. En general, preferentemente pueden usarse células del bazo, extirpado después de la última administración del antígeno de sensibilización, como células productoras de anticuerpo. En cualquier caso, las células productoras de anticuerpo recogidas después pueden someterse a fusión celular con cepas particulares de células de mieloma, una línea de células tumorales, para preparar células de hibridoma.

Una serie de líneas celulares de mieloma adecuadas que pueden usarse en la producción de células de hibridoma será bien conocida para el experto en la materia. Por ejemplo, son adecuadas para su uso para producir hibridomas de acuerdo con la presente invención líneas celulares tales como células P3-NSI/1-Ag4-1 (abreviado, células NS-1) (Köhler y col., Eur. J. Immunol., 6: 511 (1976)), células SP2/0-Ag14 (abreviado, células SP2) (Schulman y col., Nature, 276: 269 (1978)) y células FO (deSaint Groth y col., J. Immunol. Meth., 35: 1 (1980)). Puede preferirse usar células SP2. Para facilitar la recuperación del anticuerpo de interés de un sobrenadante producido por cultivo de hibridomas, puede preferirse utilizar una línea celular de mieloma que no secrete la inmunoglobulina intrínseca en células de mieloma. Por ejemplo, puede preferirse usar células NS-1 como células de mieloma para la fusión celular.

Los procedimientos por medio de los cuales una célula productora de anticuerpo y una célula de mieloma pueden fusionarse ahora son, en realidad, procedimientos rutinarios para los expertos en la materia. Simplemente a modo de ejemplo, la fusión celular puede conseguirse de acuerdo con el protocolo usado por Köhler y Milstein (Köhler y col., 1975, Nature, 256; 495).

El procedimiento de fusión celular puede realizarse en un medio nutriente habitual en presencia de un promotor de fusión. El promotor de fusión adecuado que puede usarse para producir hibridomas de acuerdo con la presente invención incluye polietilenglicol (PEG) o virus Sendai. El PEG adecuado puede tener un peso molecular medio comprendido entre 1.000 y 6.000. La fusión celular se realiza usando células productoras de anticuerpo y células de mieloma mezcladas en una relación predeterminada. Las relaciones adecuadas pueden variar de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1. RPMI 1640 puede usarse como medio de cultivo en el que puede tener lugar la fusión celular, ya que este medio favorece el crecimiento

de las células de mieloma.

Para realizar la fusión celular, los dos tipos de células (células productoras de anticuerpo y mielomas) pueden mezclarse en RPMI 1640 y mantenerse en condiciones de cultivo celular normales. Después puede añadirse una solución de polietilenglicol en una concentración del 30 al 60% (p/v) para iniciar la fusión celular. Finalmente, una vez que se ha producido la fusión celular, puede añadirse un volumen adicional de un medio adecuado y el hibridoma producido recuperarse por centrifugación para retirar el sobrenadante.

El hibridoma recuperado puede seleccionarse por cultivo en un medio de selección normal, tal como medio HAT, que contiene hipoxantina (H), aminopterina (A) y timidina (T). El cultivo en medio HAT puede continuarse durante un periodo comprendido entre varios días y unas pocas semanas hasta que se hayan destruido las células distintas del hibridoma requerido.

Cuando se confirma la presencia de colonias del hibridoma, el sobrenadante de cultivo puede explorarse con respecto a la presencia del anticuerpo monoclonal. Una exploración adecuada del anticuerpo en el sobrenadante de cultivo puede realizarse, por ejemplo, ensayando la actividad de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo por una técnica ELISA usando células inmobilizadas como antígeno (Ando Tamie y col., Introduction to Monoclonal Antibody Experiment Protocols, K dansha Scientific (1993), p. 126). Se apreciará que las células adecuadas para usarse en dicha técnica deben ser las que expresan AGR2, tales como células de cáncer metastásico. Una vez que se ha confirmado la presencia del hibridoma y el anticuerpo monoclonal deseado, el hibridoma puede clonarse para una propagación adicional usando técnicas bien conocidas (por ejemplo, clonación de anillo o clonación por dilución limitante).

Siguiendo los métodos expuestos anteriormente se permite la producción, aislamiento y clonación de un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la invención. Los expertos en la materia conocen bien técnicas adecuadas para el mantenimiento de hibridomas. Por ejemplo, los hibridomas pueden cultivarse y subcultivarse usando medios de cultivo celular conocidos, tales como RPMI 1640 o medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM). Las muestras de hibridomas producidos de la manera descrita anteriormente y que producen el anticuerpo monoclonal de la invención pueden conservarse en nitrógeno líquido antes de descongelarse para su uso futuro.

Los hibridomas de la invención son adecuados para el cultivo a gran escala, para facilitar la producción de grandes cantidades de los anticuerpos de la invención. Los hibridomas de la invención pueden cultivarse, por ejemplo, en suero bovino fetal (FCS) al 15%- RPMI 1640, y pueden prepararse anticuerpos monoclonales de la invención a partir del

sobrenadante de cultivo.

Como alternativa, pueden inyectarse hibridomas de la invención por vía intraperitoneal en ratones experimentales, para formar tumores ascíticos. Después pueden prepararse los anticuerpos monoclonales de la invención a partir del líquido ascítico.

5 Los anticuerpos monoclonales de la invención, como se hayan preparado, pueden purificarse usando técnicas de purificación de anticuerpos bien conocidas. Los ejemplos adecuados de tecnologías de purificación de anticuerpos que pueden usarse para purificar anticuerpos de la invención comprenden precipitación (desplazamiento salino) con sulfato amónico o similares, cromatografía de intercambio iónico usando un derivado de dietilamino-
10 éster (DEAR), un derivado de carboximetilo (CM) o similares, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G, entre otros, incluyendo unión al antígeno contra el que se ha inducido el anticuerpo. Se apreciará que pueden utilizarse combinaciones de las técnicas sugeridas anteriormente en la purificación del anticuerpo monoclonal.

15 La invención también proporciona un procedimiento para la preparación de un anticuerpo monoclonal de la invención, comprendiendo el procedimiento inmunizar a un animal con el péptido KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) y después seleccionar y aislar el anticuerpo.

20 La invención también proporciona un procedimiento para la preparación de un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención, comprendiendo el procedimiento inmunizar a un animal con el péptido KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2), obtener una célula productora anticuerpos a partir del animal inmunizado; y fusionar la célula productora de anticuerpos con una célula de mieloma.

25 El experto en la materia apreciará fácilmente que los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse para generar fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno. Éstos pueden generarse por manipulación de los anticuerpos monoclonales existentes, o usando los anticuerpos monoclonales como molde para la producción de fragmentos adecuados. Los mecanismos por los que pueden producirse dichos fragmentos serán bien conocidos para los expertos en la materia.

30 Meramente a modo de ejemplo, pueden obtenerse Fab, F(ab')₂ y otros fragmentos inmunorreactivos por digestión del anticuerpo monoclonal de la invención con una enzima proteolítica que no descompone el sitio de unión a antígeno (Fab) tal como papaína, pepsina o similares. Los fragmentos de unión a antígeno generados de esta manera después pueden aislarse y purificarse usando técnicas rutinarias. Los fragmentos de unión a antígeno que
35 tienen la especificidad de anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse de la

misma manera que los propios anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión a antígeno, de acuerdo con la invención pueden usarse en varios ensayos (incluyendo, pero sin limitación, los ensayos de diagnóstico y pronóstico de la invención) en los que puede ser beneficioso poder obtener información en cuanto a la localización o unión del anticuerpo o fragmento. En estos casos, puede preferirse que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, se marque usando un resto indicador. Dichos restos indicadores pueden unirse directa o indirectamente a un anticuerpo de la invención.

Los restos indicadores adecuados serán bien conocidos para los expertos en la materia, así como los procedimientos por medio de los cuales pueden unirse a los anticuerpos de la invención. Un resto indicador adecuado puede seleccionarse del grupo que consiste en un resto fluorescente; un resto luminiscente; un resto bioluminiscente; un material radiactivo; un grupo prostético, un resto colorimétrico; una nanopartícula que tiene propiedades detectables adecuadas, y un resto cromogénico.

Meramente a modo de ejemplo, y sin limitación, pueden seleccionarse restos fluorescentes adecuados del grupo que consiste en: isotiocianato de fluoresceína (FITC); rodamina (TRITC); ficoeritrina; alofocianina; cumarina (AMCA); rojo Texas; y cianina (Cys, Cy3 o Cy5). Otros restos fluorescentes adecuados que pueden usarse para marcar anticuerpos de la invención serán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

Puede conseguirse un marcaje adecuado de anticuerpos de la invención con FITC usando el siguiente protocolo. El anticuerpo de la invención se prepara como una solución de 2 mg/ml en carbonato sódico 0,1 M (pH 9,0). Se disuelve FITC en DMSO a 1 mg/ml y se añade lentamente a la solución de anticuerpo (a una concentración de aproximadamente 50 µg de FITC por ml de anticuerpo). La mezcla de anticuerpo y FITC se incuba en la oscuridad durante 8 horas a 4 grados. Después de finalizar esta primera incubación, se añade NH₄Cl 50 mM y la mezcla resultante se incuba durante 2 horas a 4 grados. Finalmente, se añaden xileno cilanol y glicerol al 0,1% y 5% respectivamente. El anticuerpo marcado de la invención después puede separarse por exclusión molecular.

A objeto de la presente divulgación, pueden tomarse restos luminiscentes y bioluminiscentes para incluir tanto restos que tienen propiedades luminiscentes por sí mismos como restos capaces de producir productos luminiscentes. El luminol representa un ejemplo adecuado de un resto luminiscente que puede usarse para marcar anticuerpos de la invención. La luciferasa proporciona un ejemplo de un resto bioluminiscente (en este caso, un resto capaz de generar un producto luminiscente) que puede usarse para marcar anticuerpos de la invención.

Los materiales radiactivos adecuados que pueden usarse para marcar anticuerpos de la invención serán evidentes para el experto en la materia. Meramente a modo de ejemplo ilustrativo, los materiales radiactivos adecuados pueden incluir radioisótopos seleccionados del grupo que consiste en: ^{125}I ; ^{131}I ; ^{35}S ; ^3H ; ^{14}C ; ^{32}P ; $^{99\text{m}}\text{TC}$ y ^{111}In .

5 Un anticuerpo de la invención puede marcarse usando grupos prostéticos que se unen entre sí con alta especificidad. Un ejemplo de dicho grupo prostético adecuado que es bien conocido para los expertos en la materia es la biotina. Un anticuerpo de la invención puede marcarse con biotina, y el anticuerpo biotinilado puede exponerse a un compañero de unión específico para la biotina (por ejemplo, avidina o estreptavidina). El compañero de unión puede
10 llevar un marcador separado, tal como un marcador fluorescente.

Los restos colorimétricos que pueden usarse para marcar anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitación: oro coloidal; y perlas coloreadas de vidrio o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex o similares).

15 Los ejemplos de restos cromogénicos que pueden usarse para marcar anticuerpos de la invención incluyen enzimas cromogénicas tales como: peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Se conocen bien diversos sustratos que pueden usarse para generar productos detectables representativos de actividad de estas enzimas y de hecho están disponibles en el mercado a partir de muchos proveedores de reactivos de laboratorio.

20 Además del marcaje directo de anticuerpos de la invención, en el que restos indicadores pueden unirse directamente al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, los anticuerpos de la invención también pueden marcarse usando técnicas de marcaje indirecto. Los procedimientos por medio de los cuales pueden marcarse indirectamente anticuerpos, tales como los anticuerpos de la invención, son bien conocidos para los expertos habituales en la materia.

25 Una manera adecuada por medio de la cual los anticuerpos de la invención pueden marcarse indirectamente es por medio de una estrategia de “anticuerpo primario”/”anticuerpo secundario”. En resumen, en dicha estrategia el anticuerpo no marcado de la invención se usa como un “anticuerpo primario” capaz de unirse a AGR2 en una muestra (por ejemplo, una muestra de un paciente). Después se usa un “anticuerpo secundario” marcado (elegido para
30 que reaccione únicamente con el anticuerpo de la invención, y no con otros materiales de la muestra) para que se una al anticuerpo primario. De esta manera, el anticuerpo no marcado de la invención se une eficazmente al marcador unido al anticuerpo secundario.

35 El marcaje de anticuerpos de la invención (directa o indirectamente) permite la detección de esos anticuerpos. Típicamente, las moléculas no unidas que llevan el marcador elegido (tales como anticuerpos marcados directamente o anticuerpos secundarios no unidos)

se retirarán de la muestra de forma que sustancialmente el único marcador que quede esté asociado con los anticuerpos unidos de la invención.

Después se realiza la detección del marcador para representar la detección de los anticuerpos unidos de la invención. El medio por el cual se detectará el marcador dependerá de la naturaleza del marcador seleccionado. Por ejemplo, un marcador fluorescente se detectará iluminando la muestra (que contiene el anticuerpo unido de la invención) con luz a la longitud de onda de excitación del marcador fluorescente, y detectando la presencia de luz a la longitud de onda de emisión del fluoróforo seleccionado.

Un anticuerpo marcado con una enzima cromogénica puede detectarse incubando la muestra (que contiene el anticuerpo unido de la invención) con un sustrato cromogénico de la enzima seleccionada y detectando la presencia del producto coloreado producido como resultado de la acción de la enzima sobre el sustrato.

Las maneras en las que pueden detectarse los anticuerpos de la invención que se han marcado usando restos indicadores alternativos serán bien conocidas para los expertos en la materia.

En otras realizaciones, la invención también proporciona kits para uso en ensayos de diagnóstico o pronóstico de la invención, comprendiendo los kits un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención. Se apreciará que dichos kits pueden usarse en el pronóstico o diagnóstico de una o más enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en: cáncer; (y particularmente cáncer metastásico; cáncer de próstata; cáncer de ovario; cáncer pancreático; cáncer de mama; cáncer de estómago; cáncer esofágico; o cáncer de colon); una enfermedad inflamatoria en general; y artritis reumatoide en particular. Los kits de acuerdo con la presente invención también pueden incluir componentes adicionales. Dichos componentes pueden incluir, por ejemplo, al menos un artículo seleccionado del grupo que consiste en: materiales de instrucción (en cualquier forma, incluyendo materiales impresos o legibles en ordenador); reactivos para uso en la detección de unión de anticuerpos (incluyendo reactivos, tales como anticuerpos secundarios marcados, que pueden usarse en la visualización de anticuerpos unidos de la invención); reactivos para uso en la incubación de anticuerpos (tales como soluciones que pueden usarse para la dilución de anticuerpos primarios o secundarios, o reactivos para uso en protocolos de marcaje cromogénico); y agentes para la visualización de núcleos celulares. Los anticuerpos secundarios marcados preferidos incluyen anticuerpos marcados con fluorescencia y anticuerpos marcados con un agente cromogénico. El anticuerpo de la invención puede proporcionarse como uno de un panel de reactivos (tales como anticuerpos adecuados distintos de los de la invención) que tienen utilidad de pronóstico o diagnóstico para incluirse en

un kit de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona un sustrato sólido al que se une un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno, de la invención. El sustrato puede comprender, por ejemplo, una serie que comprende anticuerpos de la invención. Los sustratos adecuados también pueden incluir microperlas. Se apreciará que los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en un sustrato sólido como uno de un panel de reactivos (incluyendo anticuerpos distintos de los de la invención) que tienen utilidad de pronóstico o diagnóstico.

Los inventores creen que los anticuerpos de la invención pueden ser capaces de bloquear la función de AGR2 expresada por células tumorales. Dada la especificidad excepcionalmente elevada de los anticuerpos de la invención (como se ilustra por su mayor utilidad de pronóstico y diagnóstico en comparación con anticuerpos desvelados previamente) estos anticuerpos pueden representar agentes terapéuticos muy prometedores, ya que pueden dirigirse a AGR2 sin bloquear la función de componentes relacionados que no están implicados en la progresión del cáncer. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) de AGR para uso como un medicamento. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, a usar en este aspecto de la invención preferentemente puede ser un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma PZ7A10F10.

Los medicamentos fabricados usando los anticuerpos de la invención pueden ser de utilidad en el tratamiento del cáncer y en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad metastásica (en la que la capacidad de los anticuerpos para bloquear la función de AGR2 puede ayudar a prevenir la progresión y diseminación de la metástasis). Serán evidentes para los expertos en la materia modificaciones adecuadas de anticuerpos de la invención que se van a usar como agentes terapéuticos. Meramente a modo de ejemplo, puede preferirse utilizar fragmentos de dichos anticuerpos en caso de que se desee conseguir actividad intracelular que conduzca a un efecto terapéutico. Adicionalmente o como alternativa, puede desearse “humanizar” los anticuerpos (como se considera en otras partes de la memoria descriptiva) para reducir la probabilidad de efectos secundarios indeseados producidos por la respuesta inmune del paciente al anticuerpo exógeno.

También pueden usarse anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias.

La secuencia de aminoácidos de AGR2 (Secuencia ID N°: 1) se ilustra en la sección de información de secuencia junto con la secuencia de aminoácidos del antígeno de sensibilización de Secuencia ID N°: 2, un fragmento peptídico de AGR2. Los restos

aminoacídicos 1-20 de la Secuencia ID N°: 1 constituyen una secuencia señal secretora. El fragmento peptídico mostrado en la Secuencia ID N°: 2 comprende los aminoácidos 26-40 de la secuencia ID N°: 1.

La invención se describirá a continuación haciendo referencia a los siguientes
5 Resultados Experimentales y Figuras en las que:

La Figura 1 ilustra los resultados de transferencia de western para establecer la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-AGR2 producido de acuerdo con el Ejemplo 1. La calle 1 mostrada en la Figura 2 se cargó con 0,5 µg de AGR2, mientras que la calle 2 se cargó con 0,5 µg de AGR3. La unión de anticuerpo (detectada por quimioluminiscencia)
10 indica que el anticuerpo monoclonal se unía fuertemente a AGR2 (mostrado por la fuerte señal en la calle 1), pero no se unía a AGR3 (indicado por la ausencia de señal en la calle 3).

La Figura 2 muestra inmunocitoquímica de muestras de paciente con tumor primario usando un anticuerpo monoclonal de la invención para marcar AGR2. Panel A2: mama normal;
15 Panel 2B: una sección de tumor que muestra tinción negativa para AGR2; Panel 2C: una sección de tumor que muestra tinción positiva de las células de carcinoma; Panel 2D: un mayor aumento de 2C que muestra fuerte tinción inmunocitoquímica para AGR2. La flecha indica las células tumorales que se tiñeron de forma positiva para AGR2 usando el anticuerpo de la invención. Aumentos AC x 40; D x 125.

La Figura 3 muestra la frecuencia de la categoría de la tinción (de acuerdo con la Tabla 1) de diferentes muestras de carcinoma usando un anticuerpo de acuerdo con la invención. Se tiñeron inmunocitoquímicamente carcinomas primarios de 320 pacientes para AGR2 con anticuerpo monoclonal de la invención.

La Figura 4 muestra gráficos de supervivencia para cada categoría de tinción usando el anticuerpo de la invención. La proporción acumulativa de supervivencia representa el porcentaje de supervivencia de pacientes en cada categoría de tinción cada 12 meses durante el periodo de estudio de 240 meses. Se evaluaron 315 pacientes. (a, ----) pacientes con tinción negativa para AGR2 (-), 100% para 107 pacientes; (b, ----), pacientes con tinción dudosa (+/-), 100% para 93 pacientes; (c, - - -) pacientes con un 5-25% de tinción (+), 100% para 61 pacientes; (d, - - - -) pacientes con un 25-50% de tinción (++) , 100% para 26 pacientes, y (e, - -) pacientes con un 50% o más de tinción (+++/++++), 100% para 28 pacientes. Hubo 103 observaciones censuradas en a (19 muertes u otras causas); 39 observaciones censuradas en b (16 muertes de otras causas); 17 observaciones censuradas en c (10 muertes de otras causas); 4 observaciones censuradas en d (4
35 muertes de otras causas) y 10 observaciones censuradas en e (9 muertes de otras causas).

En general, los cinco gráficos son muy significativamente diferentes (estadística de Wilcoxon $\chi^2 = 103,157$, 4 d.f., $P < 0,0001$).

La Figura 5 muestra gráficos de supervivencia para los grupos de tinción negativa (-), dudosa (+/-) y totalmente positiva (+, ++, +++/++++) para AGR2. La proporción acumulativa de supervivencia de pacientes representa el porcentaje de supervivencia de pacientes en cada categoría de tinción cada 12 meses durante el periodo de estudio de 240 meses. Se evaluaron 315 pacientes. (a, -) pacientes con tinción negativa para AGR2 (-), 100% para 107 pacientes; (b, - - -), pacientes con tinción dudosa (+/-), 100% para 93 pacientes; (c, - - - -) pacientes con tinción positiva (+, ++, +++/++++), 100% para 115 pacientes. Hubo 103 observaciones censuradas en a (19 muertes de otras causas); 39 observaciones censuradas en b (16 muertes de otras causas); 31 observaciones censuradas en c (23 muertes de otras causas). Los tres gráficos fueron muy significativamente diferentes (estadística de Wilcoxon $\chi^2 = 101,49$. 2 d.f., $P < 0,0001$).

La Figura 6 muestra gráficos de supervivencia para los grupos de tinción negativa (-) y para todos los demás grupos de tinción positiva (+/-, +, ++, +++/++++) usando un nivel de límite del 1% para la tinción de AGR2. La proporción acumulativa de pacientes que sobreviven representa el porcentaje de supervivencia de pacientes en cualquier categoría de tinción cada 12 meses durante el periodo de estudio de 240 meses. Se evaluaron 315 pacientes. (a, -) pacientes con tinción negativa para AGR2 (-). 100% para 107 pacientes. (b, -----), pacientes con tinción dudosa (+/-) agrupados con todos los demás grupos de tinción positiva (+, ++, +++/++++). 100% para 208 pacientes. Hubo 103 observaciones censuradas en a (19 muertes de otras causas); y 70 observaciones censuradas en b (39 muertes de otras causas). Los dos gráficos fueron muy significativamente diferentes (estadística de Wilcoxon $\chi^2 = 97,40$, 1 d.f., $P < 0,0001$).

25 RESULTADOS EXPERIMENTALES

EJEMPLO 1: Preparación de un hibridoma productor de anticuerpos específicos de AGR2 y producción y aislamiento de anticuerpo contra AGR2

1.1. Antígeno de Sensibilización

El fragmento peptídico KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2), que representa los restos aminoacídicos 26 a 40 de AGR2 (como se expone en la Secuencia ID N°: 1) se sintetizó *de novo* usando procedimientos sintéticos convencionales.

1.2. Inmunización

Como animales huésped a inmunizar se usaron cuatro ratones, con edades comprendidas entre 6 y 8 semanas. El fragmento peptídico KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) se usó como antígeno de sensibilización. Se administraron 50 μg /inyección del

antígeno de sensibilización KPGAKKDTKDSRPKL mediante inyección subcutánea a los ratones. Las inyecciones se administraron los días 0, 21 y 42 (con un refuerzo final antes de la fusión) para estimular una respuesta inmune contra el antígeno y para desencadenar la producción de anticuerpos. Se recogió suero preinmune el día 0.

5 **1.3. Preparación de un Hibridoma**

Se fusionaron linfocitos esplénicos del ratón que mejor respondía con células de mieloma Sp2/O-Ag-14 usando PEG (polietilenglicol) y los hibridomas resultantes se sembraron en placas de 96 pocillos para la selección de HAT. Se exploraron hibridomas productores de IgG contra el antígeno. Se expandieron colonias positivas, se ensayaron con respecto a la producción de anticuerpo y la reactividad contra antígeno (péptido) y contra proteína AGR2 recombinante. Los hibridomas seleccionados se clonaron por dilución limitante y se exploraron contra el antígeno (péptido) y contra la proteína AGR2 recombinante. El hibridoma seleccionado se usó para isotipificar el anticuerpo (G1; kappa) y para la producción y purificación de la IgG.

15 **1.4. Establecimiento de especificidad del anticuerpo monoclonal**

Figura 1. Transferencia de Western del anticuerpo seleccionado en AGR2 y AGR3

La capacidad del anticuerpo monoclonal de unirse específicamente a AGR2 se estableció por transferencia de western, como se indica a continuación. Se sometieron AGR2 recombinante purificada (05 µg, Calle 1) y AGR3 recombinante (0,5 µg, Calle 2) a electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfirieron sobre membranas de PVF. Estas membranas después se bloquearon con una solución que contenía un 5% de leche desnatada y se incubaron con una dilución 1 en 2000 del anticuerpo monoclonal anti-AGR2 durante una noche.

Después de la incubación durante una noche, la membrana se lavó y se incubó durante una hora con un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP. El anticuerpo unido se detectó por quimioluminiscencia con un kit ECL y exposición del filtro a una película fotográfica.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1. En esta Figura, puede verse que la calle 1 muestra una fuerte señal con la proteína AGR2 (flecha), pero no muestra señal con la proteína AGR3. Este resultado indica claramente que el anticuerpo monoclonal de la invención, producido de acuerdo con el protocolo indicado anteriormente, es específico para AGR2.

30 **EJEMPLO 2: Uso de diagnóstico del anticuerpo AGR2**

La detección inmunocitoquímica de AGR2 con un anticuerpo monoclonal de la invención (producido como se describe en el Ejemplo 1), a diferencia de un anticuerpo policlonal de conejo convencional conocido de la técnica anterior, permitió que la frontera

discriminatoria entre tumores de tinción positiva y negativa se redujera del 5% al 1% de las células de carcinoma teñidas. Aunque no se desea limitación por ninguna hipótesis, los inventores creen que esta mayor sensibilidad se produce como resultado de la falta de reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal con productos no relacionados, por ejemplo AGR3.

El procedimiento de tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido con anti-AGR2/PZ7A10F10, el anticuerpo monoclonal de la invención, se realiza como se indica a continuación. Se desparafinaron secciones histológicas (cortadas a 4 μm) sobre portaobjetos revestidos con APES (por una modificación del procedimiento de Maddox, P.H. y Jenkins, D.) en Xileno y se rehidrataron por medio de etanol en agua como se ha descrito previamente por Warburton y col. (1982). Se realizó una recuperación de antígeno mediante microondas (Cuevas y col., 1994). Las secciones se sumergieron en tampón citrato 10 mM pH 6,0 y se sometieron a microondas a 850 vatios durante 15 minutos usando un horno microondas doméstico. Los portaobjetos se dejaron enfriar durante 15 minutos más mientras aún estaban sumergidos en el tampón citrato. Después de la recuperación del antígeno, la actividad peroxidasa endógena en las secciones de tejido se bloqueó sumergiendo los portaobjetos en metanol al 100% que contenía un 0,05% (v/v) de H_2O_2 durante 20 minutos a temperatura ambiente (Streefkerk, 1972). Se aplicó anticuerpo monoclonal anti-AGR2/PZ7A10F10 a los portaobjetos a una dilución de 1:100 en BSA al 0,5%/PBS durante una noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. La tinción inmunocitoquímica indirecta se realizó usando un sistema polimérico marcado con HRP potenciado disponible en el mercado, el *DAKO EnVision+System, peroxidase(DAB)* (Dako Ltd, Ely, Reino Unido) (Heras, 1995), preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después, las secciones se lavaron en agua corriente antes de someterse a una tinción de contraste en hemalum de Mayer. Después se deshidrataron por medio de etanol graduado y xileno y se montaron en DPX mountant (Merck, Poole, Reino Unido).

Usando estos niveles discriminatorios (que se han hecho disponibles por el anticuerpo de la invención y los ensayos de la invención), la asociación de la supervivencia del paciente con el tiempo fue significativamente diferente entre los tumores de tinción positiva y de tinción negativa. El valor χ^2 de significado (χ^2) (estadística de Wilcoxon) y el riesgo relativo (RR) (análisis univariante de Cox) fueron $\chi^2 = 46,5$, RR = 3,8 (IC 95% 2,7-5,3) usando el anticuerpo policlonal y $\chi^2 = 97,4$, RR = 30,5 (IC 95% 11-86) usando el monoclonal.

Esta asociación mucho mayor de tinción inmunocitoquímica positiva para AGR2 con muerte prematura de pacientes obtenida con el anticuerpo monoclonal significa que cuando se compara con otros marcadores convencionales (tamaño del tumor, grado histológico, ganglios

linfáticos implicados en el tumor) y nuevos marcadores (por ejemplo, tinción para S100A4, S100P, osteopontina, c-met, ER α , PgR, p53, catepsina D, *c-erbB-2*), se convierte en la variable de pronóstico independiente más significativa en un ensayo de análisis de regresión multivariante de Cox ($\chi^2 = 14,3$, $P < 0,001$, RR = 10; IC 95% 3-33).

5 Previamente, la contribución al pronóstico de marcadores convencionales y nuevos combinados significa que la tinción para AGR2 usando un anticuerpo policlonal no estaba asociada independientemente con la supervivencia, superándose su contribución por estos otros marcadores. De esta manera, los anticuerpos monoclonales de la invención y los ensayos de la invención proporcionan notables ventajas con respecto a la técnica anterior.

10 **EJEMPLO 3: Uso de diagnóstico del anticuerpo AGR2 - segundo estudio**

En una ampliación del estudio indicado anteriormente, se investigaron tejidos de cáncer de mama de 320 pacientes que padecían cáncer de mama avanzado y se trataron por mastectomía y mastectomía radical usando los anticuerpos de la invención. Este estudio pretendía investigar adicionalmente la utilidad de pronóstico y diagnóstico de los anticuerpos de la invención.

15 Los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron las muestras se presentaron entre los años 1976 y 1982 en la clínica de cirugía general en la Región de Merseyside del Noroeste de Inglaterra. Este grupo de pacientes representaba un buen reflejo de la población ya que en el Reino Unido se dispone de tratamiento médico gratuito. El intervalo de edades de los pacientes fue de 29-92 años con una edad media de 57 años. Se realizó el seguimiento de estos pacientes durante un periodo medio de 16 años con un intervalo de 14-20 años. Las supervivencias de los pacientes se actualizaron hasta el 31 agosto de 1995. El estudio además investigó las asociaciones entre el marcaje de muestras usando los anticuerpos de la invención y las tasas de supervivencia de los pacientes.

25 La inmunotinción usando el anticuerpo monoclonal anti-AGR2/7A10 (producido por el hibridoma PZ7A10F10) se realizó usando los protocolos descritos para el estudio anterior (en resumen, inmunotinción de secciones histológicas desparafinadas, visualizándose el anticuerpo primario unido por medio del sistema Envision en el que la producción de un color marrón indica la unión del anticuerpo).

30 **Análisis de Tinción**

35 Se observaron tinciones de color marrón cuando estaba presente AGR2. El porcentaje de células cancerosas teñidas se determinó usando microscopía óptica y este valor se usó para asignar la muestra a uno de seis grupos, como se muestra en la Tabla 1 presentada más adelante. Para los fines del estudio se ignoró cualquier inmunotinción minoritaria de células normales (no tumorales).

Análisis Estadístico

El análisis de supervivencia se realizó para determinar cualquier asociación entre los tiempos de supervivencia dentro de cada categoría de tinción en el periodo de seguimiento total de 240 meses. Sólo se analizaron los pacientes que murieron de cáncer. Las curvas de supervivencia se construyeron a partir de la tabla de vida usando gráficos de Kaplan-Meier y los datos de supervivencia se analizaron usando la Estadística de Wilcoxon (Gehan). Los pacientes que murieron de otras causas distintas de cáncer y que estaban muertos al final del periodo de seguimiento se excluyeron de la consideración. Se realizó un análisis de regresión univariante de Cox para obtener los valores de riesgo relativo con intervalos de confianza del 95% para cada una de las categorías que se comparaban. También se realizó un análisis de regresión multivariante de Cox con todas las variables presentes para determinar el significado relativo entre factores de pronóstico y para investigar si la supervivencia del paciente con AGR2 era independiente de estos factores de pronóstico. Se usó un procedimiento de selección directo por etapas. Se usaron tablas cruzadas para comparar los grupos de pacientes separados en categorías negativa (no teñido) y positiva (teñido) para dos marcadores de pronóstico diferentes. Se realizó un Ensayo Exacto de Fisher bilateral para ensayar cualquier diferencia significativa entre esos tumores teñidos inmunocitoquímicamente para AGR2 y los positivos para marcadores patológicos o para marcadores inmunohistoquímicos elegidos (que también se consideran de relevancia para pronóstico o diagnóstico). Los marcadores patológicos usados incluían el grado histológico, tamaño del tumor y estado de los ganglios, mientras que el grupo de marcador inmunocitoquímico incluía S100P, osteopontina, receptor de estrógenos α (ER α), c-erbB-2, c-erbB-3, S100A4, receptor de progesterona (PgR), p53, catepsina D, pS2 y c-met en el tumor primario. Se evaluó la correlación de los datos generados a partir del marcaje de AGR2 usando un anticuerpo monoclonal de la invención, y los datos generados en el estudio previo usando anticuerpo policlonal como comparación, usando la función kappa en tablas cruzadas. La puntuación kappa se proporcionó para mostrar si había posibles concordancias sobre el riesgo entre las dos variables. Todos los cálculos estadísticos se realizaron usando el Statistical Package for the Social Sciences versión 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

30 RESULTADOS

Tinción inmunocitoquímica para AGR2 usando el anticuerpo monoclonal

La mayor parte de la mama normal no se tiñó por el anticuerpo monoclonal contra AGR2 (Figura 2A) aunque hubo una tinción débil muy ocasional de unidades ductolobulillares terminales (Figura 2B). Esta tinción se distinguió fácilmente de la tinción observada en células cancerosas marcadas positivamente. La tinción de carcinomas (Figura 2C) se localizaba

principalmente en el citoplasma presentando un aspecto granular y en la membrana (Figura 2D).

Se evaluaron muestras de los carcinomas con respecto a la tinción. Los pacientes se dividieron en 6 categorías de acuerdo con el porcentaje de células de carcinoma a las que se unió el anticuerpo de la invención (de acuerdo con la Tabla 1).

El grupo ++++ (tinción por encima del 75% de células de carcinoma) se agrupó con el grupo +++ (tinción del 50-75%) debido al número relativamente pequeño de muestras en estas dos categorías. De las 320 muestras malignas evaluadas, 110 (el 34%) no contenían células que se unieran a los anticuerpos de la invención (muestras “no teñidas”, mostradas como -), 99 (el 30%) presentaron unión del anticuerpo de la invención a menos de un 5% de las células tumorales presentes (“tinción dudosa”, mostrada como +/-), 62 (el 19%) presentaron unión del anticuerpo al 5-25% de las células tumorales presentes (mostrado como +), 26 (el 8%) presentaron unión del anticuerpo de la invención al 25-50% de las células tumorales presentes (mostrado como ++) y 28 (el 9%) mostraron unión del anticuerpo de la invención al 50-100% de las células tumorales presentes (mostrado como ++++). La Figura 3 muestra las frecuencias para cada categoría de tinción.

Asociación de AGR2 con otras variables patológicas e histológicas

La tinción inmunocitoquímica para AGR2 usando anticuerpo monoclonal se evaluó usando tablas cruzadas para compararla con otras variables patológicas e inmunocitoquímicas. Las variables patológicas incluían grado histológico, tamaño del tumor y estado de ganglios, mientras que las variables inmunocitoquímicas incluían tinción para AGR2 usando un anticuerpo policlonal, para S100P, osteopontina, receptor de estrógenos α (ER α), c-erbB-2, c-erbB-3, S100A4, receptor de progesterona (PgR), p53, catepsina D, pS2 y para c-met. Las comparaciones se realizaron usando tablas de dos por dos y se evaluaron usando el Ensayo Exacto de Fisher (bilateral). La tinción inmunocitoquímica para AGR2 se fijó al nivel de límite del 1%, es decir, el grupo dudoso (+/-) se incorporó en los otros grupos de tinción positiva, dejando el grupo de tinción negativa como los tumores con menos del 1% de células de carcinoma teñidas.

La Tabla 2 muestra la asociación de tinción para AGR2 con otras variables patológicas. Sólo el estado de los ganglios ($P = 0,036$) mostró una asociación significativa con tinción positiva para AGR2. La comparación también se realizó al nivel de límite del 5% para la tinción de AGR2 (no mostrada), es decir, el grupo dudoso (+/-) se incorporó en el grupo de tinción negativa (-), dejando el grupo de tinción positiva que consistía en todos los carcinomas positivos definitivamente (+, ++, +++/++++). Los resultados fueron similares, sin embargo, el estado de los ganglios ahora mostró únicamente un significado dudoso ($P = 0,056$) de

asociación con la tinción para ARG2.

Las tablas cruzadas de tinción para AGR2 se realizaron inicialmente al de nivel límite del 1%. Por el contrario, la tinción para otros marcadores tumorales que mostraron una asociación con el resultado del paciente en cáncer de mama se fijó al nivel que consiguió la correlación más significativa, normalmente el 5%. De todas las variables moleculares, las tinciones para S100P ($P < 0,0001$), osteopontina ($P < 0,0001$), ER α ($P = 0,002$), c-erbB-3 ($P = 0,001$), S100A4 ($P < 0,0001$), PgR ($P < 0,0001$), pS2 ($P = 0,004$) y c-met ($P < 0.0001$) mostraron una asociación significativa con la tinción positiva para AGR2.

Si el nivel de límite para la tinción para AGR2 se fijó al 5%, el significado de los resultados obtenidos fue menor que el nivel límite del 1% (no mostrado). Esto indica la relevancia sorprendentemente fuerte de pronóstico o diagnóstico de cualquier unión del anticuerpo de la invención por células tumorales en una muestra del paciente.

El significado de la tinción de AGR2 en relación con la supervivencia del paciente

Este segundo estudio pretendía investigar si la unión de un anticuerpo de la invención a una muestra de un paciente (tal como células tumorales en una muestra de tumor primario) está asociada con la longitud de la supervivencia del paciente en caso de cáncer de mama. Una reducción de la longitud de la supervivencia generalmente está asociada con la enfermedad metastásica que se produce a partir de tumores primarios. Para evaluar la asociación, se representaron y compararon curvas de supervivencia para pacientes que presentaban diferentes niveles de unión de anticuerpo a células tumorales en sus muestras (Figura 4).

Usando la estadística de Wilcoxon Gehan, hubo una diferencia significativa global en los tiempos de supervivencia de pacientes con las 5 categorías diferentes de carcinomas teñidos (ensayo de Wilcoxon $\chi^2 = 103,16$, 4 d.f., $P < 0,0001$). El 96% de los 107 pacientes que se clasificaron como teñidos negativamente (-) estaban vivos al final del estudio con un tiempo medio de supervivencia de > 216 meses. En el grupo de tinción dudosa (+/-), la proporción acumulativa de supervivencia de los pacientes fue del 38% para 93 pacientes y el tiempo medio de supervivencia fue de 87 meses. Para los pacientes con tumores que mostraron un 5-25% (+) de tinción positiva usando el anticuerpo de la invención, la proporción acumulativa de supervivencia fue del 21% y el tiempo medio de supervivencia fue de 65 meses. No hubo supervivientes (0%) entre los 26 pacientes del grupo con tumores que contenían un 25-50% (++) de células de carcinoma que se unían al anticuerpo de la invención, y el tiempo medio de supervivencia fue sólo de 45 meses. Para los pacientes cuyos tumores contenían más del 50% de células de carcinoma (+++/++++) que se unen a un anticuerpo de la invención, la proporción acumulativa de supervivencia para los 28 pacientes fue del 21% y el tiempo medio de

supervivencia fue de 52 meses (Figura 4). El riesgo relativo (R.R.) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%) correspondiente a diferentes combinaciones de categorías de tinción se detallan en la Tabla 4.

5 En la Figura 6, de los 107 pacientes cuyas células tumorales se clasificaron como sin unión a un anticuerpo de la invención, el 96% de ellos sobrevivieron hasta el final del estudio con un tiempo medio de supervivencia de >216 meses. La proporción acumulativa de supervivencia para los que mostraron tinción positiva para AGR2 (+/-,+,++,+++ /++++) fue del 26% al final del estudio con un tiempo medio de supervivencia de 69 meses. El R.R. se elevó a 30,5 con un IC 95% de 11,3-82,5 (Figura 6). Esto ilustra que cualquier unión de un anticuerpo
10 de la invención a células tumorales presentes en la muestra de un paciente es predictiva y/o diagnóstica de la enfermedad metastásica. Que esto es un marcador más preciso y sensible que la unión usando otros anticuerpos anti-AGR2 conocidos de la técnica anterior se indica claramente por los resultados del estudio anterior (en el que se comparaba la utilidad de diagnóstico/pronóstico de anticuerpos de acuerdo con la invención con la de anticuerpos
15 policlonales conocidos inducidos contra AGR2).

Determinación de si la supervivencia del paciente con AGR2 era independiente de otros factores de pronóstico

Los datos de supervivencia para muestras que contenían células tumorales que se unen a anticuerpos de la invención, y datos comparables de todas las variables patológicas y la
20 mayoría de las variables de tumores que se evaluaron previamente usando tablas cruzadas se introdujeron en un análisis de regresión múltiple de Cox (Materiales y Procedimientos). La tinción para AGR2 se fijó al nivel de límite óptimo del 1% mientras que la tinción para la mayoría de los otros parámetros se fijó a los niveles óptimos de límite del 5% para la supervivencia de los pacientes en un análisis univariante. La tinción para c-erbB-3 y pS2 se
25 omitió del análisis, ya que no mostraron una correlación significativa en el análisis univariante con la supervivencia de los pacientes en este grupo particular de pacientes. La catepsina D se fijó a un nivel de límite del 1% ya que solamente este límite mostró significado en el análisis univariante en un estudio previo con este grupo particular de pacientes. De todos los factores investigados, sólo la unión de un anticuerpo de la invención, o la tinción usando osteopontina,
30 c-erbB-2, ER α , c-met y S100A4 fueron independientes y alcanzaron significativamente una asociación con los tiempos de supervivencia de los pacientes. Se descubrió que la presencia de células a las que se une un anticuerpo de la invención (mostrado como "AGR2") era la variable independiente más significativa con respecto a la supervivencia de los pacientes en este análisis (Tabla 5).

35

Información de Secuencia

Secuencia ID N°: 1 (Secuencia de aminoácidos de AGR2 humana)

```

mekipvsafi llvalsytla rdtvkpgak kdtkdsrpkl pqtlsrgwgd qliwtqyee
alyksktsnk plmiihhde cphsqalkkv faenkeiqkl aeqfvllnlv yettdkhlsp
dgqyvprimf vdpsltvrad itgrysnrly ayepadtall ldnmkkalkl lktel

```

5

Secuencia ID N°: 2 (Secuencia de aminoácidos de antígeno de sensibilización)

kpgakkdtkdsrpkl

Tablas

| Porcentaje de células tumorales teñidas (%) | Clasificación |
|---|---------------|
| <1 | - |
| 1-5 | +/- |
| 5-25 | + |
| 25-50 | ++ |
| 50-75 | +++ |
| 75-100 | ++++ |

Leyenda de la Tabla 1. Clasificación de pacientes con cáncer de mama basada en inmunomarcaje en el tumor primario usando anticuerpos de la invención. Sistema usado basado en el porcentaje de células malignas que se marcaron positivamente usando un anticuerpo de la invención.

10 Tabla 2. Asociación de tinción para AGR2 al nivel de límite del 1% con variables patológicas.

| Variables patológicas (n° de pacientes) | Número de AGR2 ^a (-) (%) | Número de AGR2 ^a (+) (%) | Ensayo Exacto de Fisher ^b (bilateral) |
|--|--|--|---|
| Grado (total 285) | | | |
| Grado 1,2 | 67 (75,3) | 146 (74,5) | 1,000 |
| Grado 3 | 22 (24,7) | 50 (25,5) | |
| Tumor (total 304) | | | |
| T1,2 | 83 (80,6) | 150 (74,6) | 0,256 |
| T3,4 | 20 (19,4) | 51 (25,4) | |

(cont)

| Variables patológicas (nº de pacientes) | Número de AGR2 ^a (-) (%) | Número de AGR2 ^a (+) (%) | Ensayo Exacto de Fisher ^b (bilateral) |
|--|--|---|---|
| Ganglios (total 231) | | | |
| Ganglio (-) | 48 (63,2) | 75 (48,4) | 0,036 |
| Ganglio (+) | 28 (36,8) | 80 (51,6) | |

Leyenda de la Tabla 2

^a Tinción inmunocitoquímica para AGR2 al nivel de límite del 1%. (-) Indica el grupo negativo mientras que (+) indica todos los demás grupos positivos incluyendo el grupo de tinción dudosa (+/-).

^b Se usó el Ensayo Exacto de Fisher (bilateral) para evaluar el significado de cualquier asociación entre AGR2 y otras variables patológicas. Los que fueron significativos ($P < 0,05$) se muestran en negrita.

Tabla 3. Asociación de tinción para AGR2 al nivel de límite del 1% con tinción para marcadores moleculares.

| Tinción para variables moleculares ^a (número de pacientes) | Número de AGR2 ^b (-) (%) | Número de AGR2 ^b (+) (%) | Ensayo exacto de Fisher ^c (bilateral) |
|---|--|--|---|
| S100P (total 280) | | | |
| S100P (-) | 82 (82,0) | 51 (28,3) | <0,0001 |
| S100P (+) | 18 (18,0) | 129 (71,7) | |
| Osteopontina (total 306) | | | |
| OPN (-) | 74 (68,5) | 29 (14,6) | <0,0001 |
| OPN (+) | 34 (31,5) | 169 (85,4) | |
| ER α (total 313) | | | |
| ER α (-) | 64 (58,7) | 81 (39,7) | 0,002 |
| ER α (+) | 45 (41,3) | 123 (60,3) | |
| C-erbB-2 (total 314) | | | |

(cont)

| Tinción para variables moleculares ^a (número de pacientes) | Número de AGR2 ^b (-) (%) | Número de AGR2 ^b (+) (%) | Ensayo exacto de Fisher ^c (bilateral) |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| c-erbB-2 (-) | 87 (80,6) | 155 (75,2) | 0,324 |
| c-erbB-2 (+) | 21 (19,4) | 51 (24,8) | |
| C-erbB-3 (total 309) | | | |
| c-erbB-3 (-) | 58 (53,7) | 67 (33,3) | 0,001 |
| c-erbB-3 (+) | 50 (46,3) | 134 (66,7) | |
| S100A4 (total 318) | | | |
| S100A4 (-) | 96 (87,3) | 96 (46,2) | <0,0001 |
| S100A4 (+) | 14 (12,7) | 112 (53,8) | |
| PgR (total 305) | | | |
| PgR (-) | 79 (75,2) | 109 (54,5) | <0,0001 |
| PgR (+) | 26 (24,8) | 91 (45,5) | |
| p53 (total 318) | | | |
| p53 (-) | 71 (65,1) | 122 (58,4) | 0,277 |
| p53 (+) | 38 (34,9) | 87 (41,6) | |
| Catepsina D (total 249) | | | |
| Cat D (-) | 38 (47,5) | 66 (39,1) | 0,218 |
| Cat D (+) | 42 (52,5) | 103 (60,9) | |
| pS2 (total 315) | | | |
| pS2 (-) | 76 (69,7) | 108 (52,4) | 0,004 |
| pS2 (+) | 33 (30,3) | 98 (47,6) | |
| C-met (total 280) | | | |

(cont)

| Tinción para variables moleculares ^a (número de pacientes) | Número de AGR2 ^b (-) (%) | Número de AGR2 ^b (+) (%) | Ensayo exacto de Fisher ^c (bilateral) |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| c-met (-) | 56 (57,7) | 28 (15,3) | <0,0001 |
| c-met (+) | 41 (42,3) | 155 (84,7) | |

Leyenda de la Tabla 3

^a Tinción inmunocitoquímica para variables moleculares a un nivel de límite del 5%. - y +/- se agrupan como (-) y +, ++, +++/++++ se agrupan como (+).

^b Tinción inmunocitoquímica para AGR2 al nivel de límite del 1%. (-) indica el grupo negativo y (+) indica todos los demás grupos (+/-, +, ++, +++/++++).

^c Se usó el Ensayo Exacto de Fisher (bilateral) para evaluar cualquier asociación significativa entre la tinción para AGR2 y la tinción para otras variables moleculares. Las que fueron significativas ($P < 0,005$) se muestran en negrita.

Tabla 4. Comparación por parejas entre cada categoría de tinción para AGR2.

| Categorías de tinción ^a | χ^2 ^β | d.f. ^c | P ^d | R.R. ^e | I.C. 95% ^e |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------|-----------------------|
| Global | 103,16 | 4 | <0,0001 | N.A. | N.A. |
| - y +/- | 68,19 | 1 | <0,0001 | 24,1 | 8,71-66,6 |
| - y + | 84,27 | 1 | <0,0001 | 33,9 | 12,1-94,8 |
| - y ++ | 84,80 | 1 | <0,0001 | 52,9 | 18,1-155 |
| - y +++ | 60,18 | 1 | <0,0001 | 36,1 | 12,2-107 |
| +/- y + | 1,08 | 1 | 0,298 | 1,41 | 0,94-2,10 |
| +/- y ++ | 4,53 | 1 | 0,033 | 2,20 | 1,33-3,63 |
| +/- y +++ | 1,71 | 1 | 0,192 | 1,50 | 0,88-2,56 |
| + y ++ | 2,36 | 1 | 0,124 | 1,56 | 0,93-2,61 |
| + y +++ | 0,656 | 1 | 0,418 | 1,07 | 0,62-1,84 |

(cont)

| Categorías de tinción ^a | χ^2 ^b | d.f. ^c | <i>P</i> ^d | R.R. ^e | I.C. 95% ^e |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| ++ y +++ | 0,026 | 1 | 0,871 | 1,46 | 0,78-2,73 |

Leyenda de la Tabla 4

^a Las categorías de tinción para AGR2 se definen en la Tabla 1 y las comparaciones por parejas corresponden a las de los gráficos de supervivencia de la Figura 5.

^b Ensayo χ^2 usando la estadística de Wilcoxon.

^c Grados de libertad.

^d Valores de probabilidad de χ^2 . Los valores de *P* que fueron significativos se muestran en negrita.

^e Riesgo negativo para supervivencia de pacientes (R.R.) e intervalo de confianza del 95% (I.C. 95%) del análisis de regresión múltiple de Cox.

Tabla 5. Resultados del análisis de regresión múltiple de Cox usando todas las variables patológicas y la mayoría de las variables moleculares.

| Variables de tumor ^a | β ^b | SE ^c | χ^2 ^d | d.f. | <i>P</i> ^e | R.R. ^f | I.C. 95% ^f |
|---------------------------------|----------------------|-----------------|-----------------------|------|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| mAGR2 | 2,30 | 0,61 | 14,3 | 1 | <0,0001 | 10,0 | 3,03-33,1 |
| Osteopontina | 1,65 | 0,61 | 7,31 | 1 | 0,007 | 5,23 | 1,58-17,3 |
| c-erbB-2 | 0,82 | 0,31 | 6,83 | 1 | 0,009 | 2,27 | 1,23-4,21 |
| ER α | -0,65 | 0,27 | 5,59 | 1 | 0,018 | 0,52 | 0,31-0,90 |
| c-met | 1,61 | 0,76 | 4,52 | 1 | 0,034 | 5,00 | 1,13-22,0 |
| S100A4 | 0,54 | 0,31 | 2,97 | 1 | 0,085 | 1,71 | 0,93-3,16 |

Leyenda de la Tabla 5

^a Variables de tumor que mostraron una asociación significativa e independiente con la supervivencia del paciente en análisis multivariante. Las variables que no alcanzaron un nivel significativo independiente con la supervivencia del paciente fueron S100P, grado histológico, tamaño del tumor, estado de ganglios, p53, PgR, Cathepsina D.

^b Valor del parámetro β en el análisis de regresión múltiple de Cox.

^c Error típico de β .

^d Parámetro estadístico χ^2 generado a partir del análisis de regresión múltiple de Cox.

^e Probabilidad de χ^2 . En general $\chi^2 = 77,83$, 7 d.f., *P* < 0,0001.

^f Riesgo relativo (R.R) para la supervivencia del paciente e intervalo de confianza del 95% (I.C. 95%) del análisis multivariante.

REFERENCIAS

- 5 Innes H.E., Liu D., Barraclough R., Davies M.P.A., O'Neill P.A., Platt-Higgins A., de Silva Rudland S., Sibson D.R. and Rudland P.S. (2006). Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally-treated breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 94, 1057-1065
- 10 Maddox, P.H. and Jenkins, D., 3-Aminopropyltriethoxysilane (APES): a new advance in section adhesion. *J Clin Pathol.* 1987; 40: 1256-1257
- Warburton, M.J., Mitchell, D., Ormerod, E.J., and Rudland, P.S. Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the resting, pregnant, lactating and involuting rat mammary gland. (1982) *J. Histochem. Cytochem.*, 30: 667-676
- 15 Cuevas, E.C., Bateman, A.C., Wilkins B.S. y col. Microwave antigen retrieval in immunocytochemistry: a study of 80 antibodies, (1994) *J. Clin. Pathol.*, 47, 448-452
- 20 Streefkerk, J.G. Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol. (1972) *J. Histochem. Cytochem.*, 20, 829
- Heras, A. y col. Enhanced labelled-polymer system for immunohistochemistry. XVth Eur Cong Pathol. Copenhagen, Denmark 1995; Sept 3-8
- 25 Fletcher, G. y col. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4-4a and dystroglycan (2003). *Br-J. Cancer*, 88, 579-585.

LISTA DE SECUENCIAS

- 30 <110> THE UNIVERSITY LIVERPOOL
BARRACLOUGH, ROGER
BARRAGLOUGH, DONG LIU
RUDLAND, PHILIP
- 35 <120> ANTICUERPOS, ENSAYOS E HIBRIDOMAS

<130> P90181PWO

5

<150> GB0616929.6

<151> 26-08-2006

<160> 2

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

Met Glu Lys Ile Pro Val Ser Ala Phe Leu Leu Leu Val Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Tyr Thr Leu Ala Arg Asp Thr Thr Val Lys Pro Gly Ala Lys Lys Asp
 20 25 30
 Thr Lys Asp Ser Arg Pro Lys Leu Pro Gln Thr Leu Ser Arg Gly Trp
 35 40 45
 Gly Asp Gln Leu Ile Trp Thr Gln Thr Tyr Glu Glu Ala Leu Tyr Lys
 50 55 60
 Ser Lys Thr Ser Asn Lys Pro Leu Met Ile Ile His His Leu Asp Glu
 65 70 75 80
 Cys Pro His Ser Gln Ala Leu Lys Lys Val Phe Ala Glu Asn Lys Glu
 85 90 95
 Ile Gln Lys Leu Ala Glu Gln Phe Val Leu Leu Asn Leu Val Tyr Glu
 100 105 110
 Thr Thr Asp Lys His Leu Ser Pro Asp Gly Gln Tyr Val Pro Arg Ile
 115 120 125
 Met Phe Val Asp Pro Ser Leu Thr Val Arg Ala Asp Ile Thr Gly Arg
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Arg Leu Tyr Ala Tyr Glu Pro Ala Asp Thr Ala Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu Asp Asn Met Lys Lys Ala Leu Lys Leu Leu Lys Thr Glu Leu
 165 170 175

<210> 2

<211> 15

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Pro Gly Ala Lys Lys Asp Thr Lys Asp Ser Arg Pro Lys Leu
 1 5 10 15

10

REIVINDICACIONES

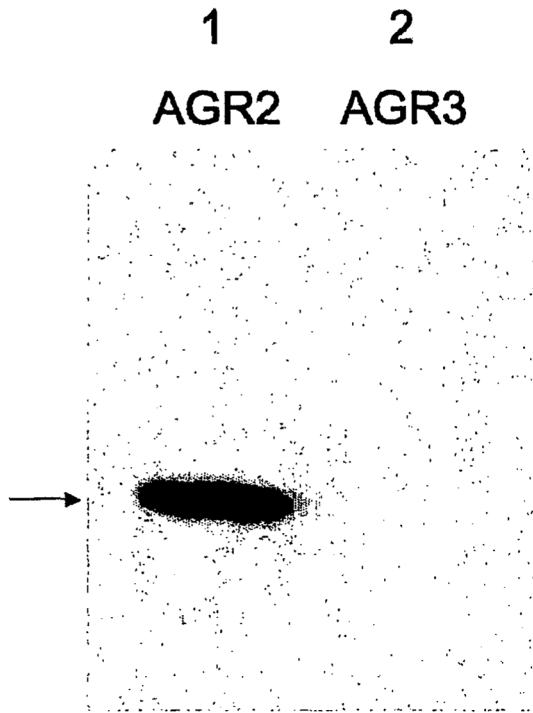
1. Un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) de AGR2.
2. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la reivindicación 1, que no se une a AGR3; y/o que se une al mismo antígeno que el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma PZ7A10F10 depositado a tenor del Tratado de Budapest y al que se le ha asignado el número de acceso 06082201.
3. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento se marca con un resto indicador seleccionado entre el grupo que consiste en: un resto luminiscente; un resto bioluminiscente; un material radiactivo; un grupo prostético; un resto colorimétrico; una nanopartícula detectable; un resto cromogénico; y un resto fluorescente, que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en: isotiocianato de fluoresceína (FITC); rodamina (TRITC); ficoeritrina; aloficocianina; cumarina (AMCA); rojo Texas; cianina (Cy2), cianina (Cy3); y cianina (Cy5).
4. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer usando un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2).
5. Un procedimiento para diagnosticar cáncer de acuerdo con la reivindicación 4, comprendiendo el procedimiento:
poner en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2); y ensayar la unión del anticuerpo a la muestra del paciente,
en el que la unión del anticuerpo a la muestra del paciente es predictiva de enfermedad metastásica en el paciente.
6. Un procedimiento *in vitro* para evaluar la probabilidad de desarrollar cáncer usando un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un

epítoto dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2).

- 5 7. Un procedimiento para evaluar la probabilidad de desarrollar cáncer de acuerdo con la reivindicación 6, comprendiendo el procedimiento: poner en contacto una muestra de un paciente con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítoto dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2); y ensayar la unión del anticuerpo a la muestra del paciente, en el que la unión del anticuerpo a la muestra del paciente indica que el paciente tiene una probabilidad elevada de desarrollar enfermedad metastásica.
- 10 8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el cáncer es un cáncer metastásico.
- 15 9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el ensayo de la unión del anticuerpo a la muestra del paciente utiliza una técnica seleccionada entre el grupo que consiste en: marcado inmunocitoquímico de una muestra de tejido; un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA); inmunoensayo de quimioluminiscencia; inmunoensayo de fluorescencia; y separación de células activadas por fluorescencia (FACS).
- 20 10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que:
- 25 i) la muestra del paciente comprende células tumorales, y el ensayo comprende ensayar la unión del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, a células tumorales en la muestra del paciente; y/o
- 30 ii) la muestra del paciente se selecciona entre el grupo que consiste en: una muestra de sangre; una muestra de biopsia; una muestra de histología; y una muestra de criotomía; y/o el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, usado es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 11. Un kit que comprende un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítoto dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2).
12. Un kit de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende un anticuerpo monoclonal, o

- 5 fragmento de unión a antígeno del mismo, producido por el hibridoma PZ7A10F10 depositado a tenor del Tratado de Budapest y que recibió el número de acceso 06082201; y/o al menos un artículo seleccionado del grupo que consiste en: materiales de instrucción para usar el kit; reactivos para uso en la detección en la unión del anticuerpo; reactivos para uso en la incubación de anticuerpo; y reactivos para la visualización de núcleos celulares.
- 10 13. Un soporte sólido que comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) inmovilizado en el mismo.
- 15 14. Un soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, producido por el hibridoma PZ7A10F10 depositado a tenor del Tratado de Budapest y que recibió el número de acceso 06082201; y/o en el que el soporte sólido es una matriz.
- 20 15. Un hibridoma PZ7A10F10 depositado a tenor del Tratado de Budapest y que recibió el número de acceso 06082201.
- 25 16. Un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo dentro de la secuencia KPGAKKDTKDSRPKL (Secuencia ID N°: 2) de AGR2 para uso como un medicamento.
17. Un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 16, para uso como un medicamento en la prevención y/o tratamiento de cáncer y/o una enfermedad inflamatoria.

Figura 1



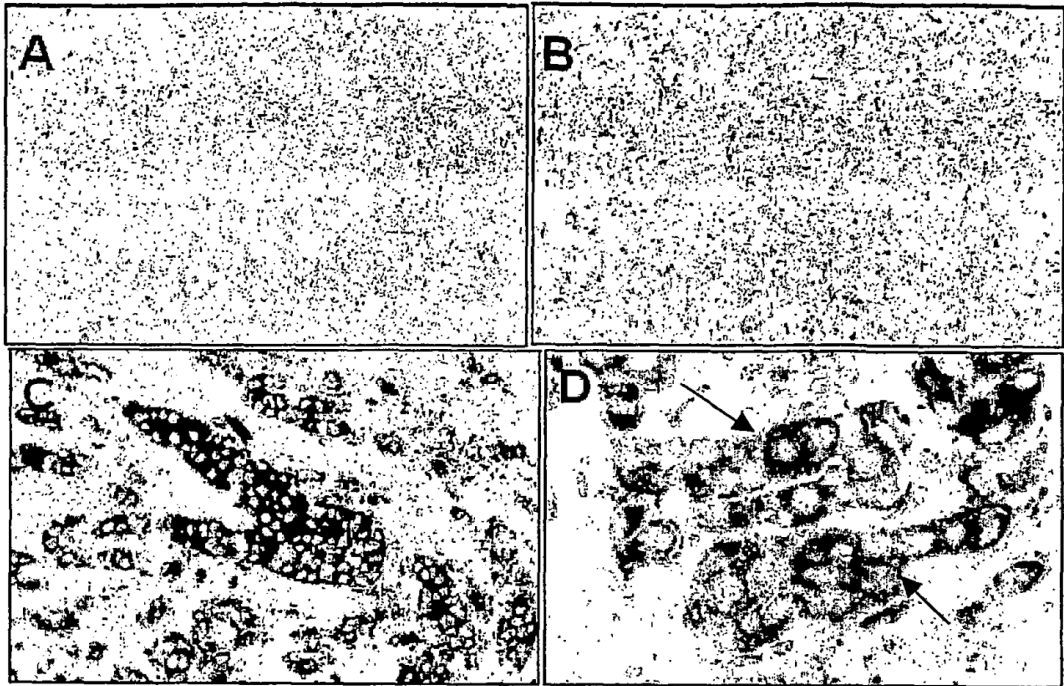


Figura 2.

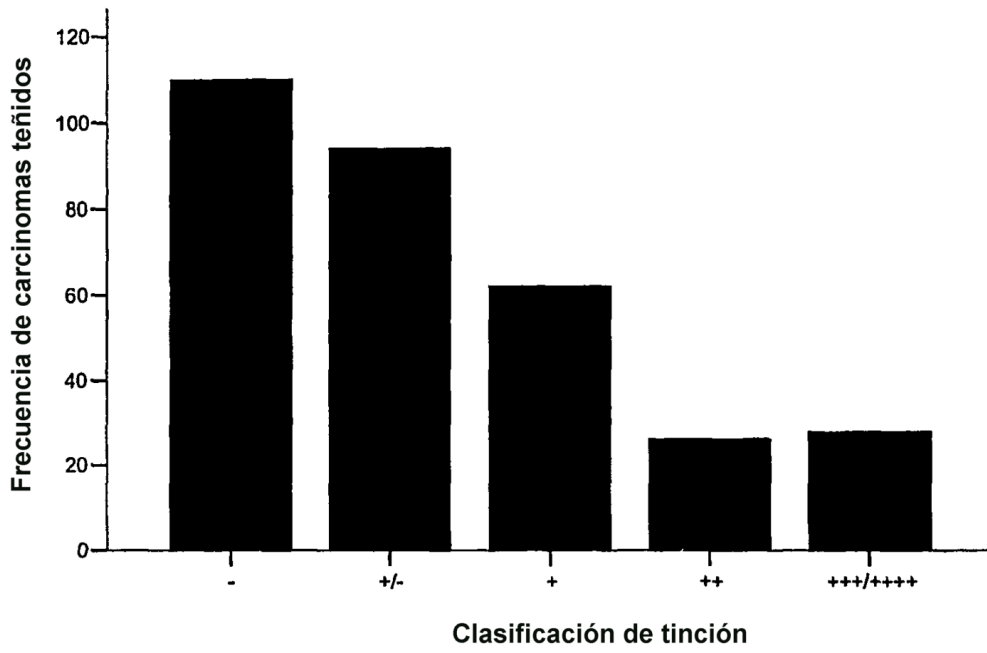


Figura 3.

Figura 4

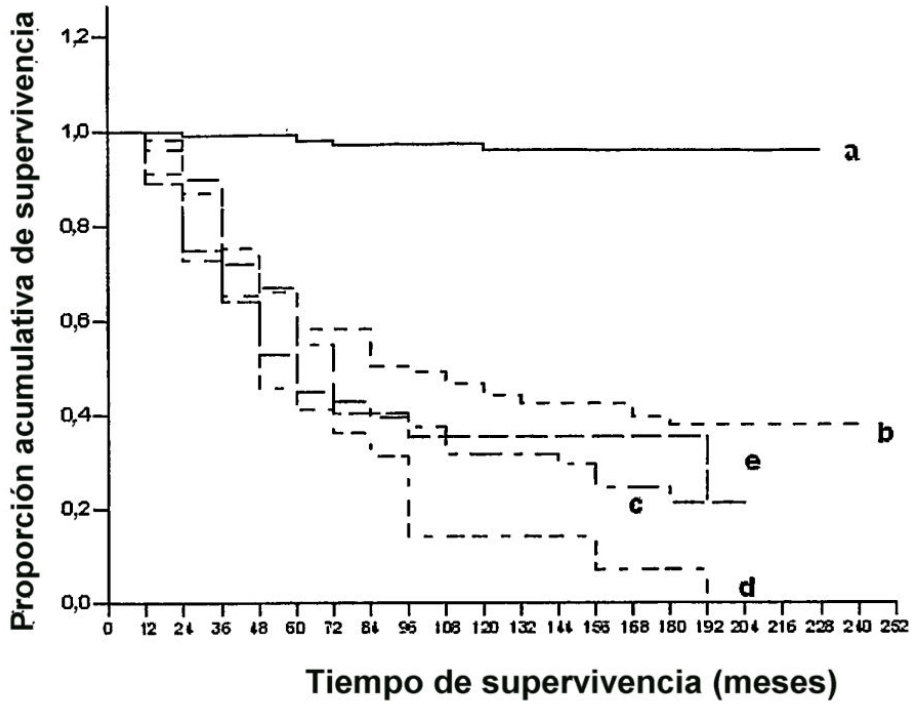


Figura 5

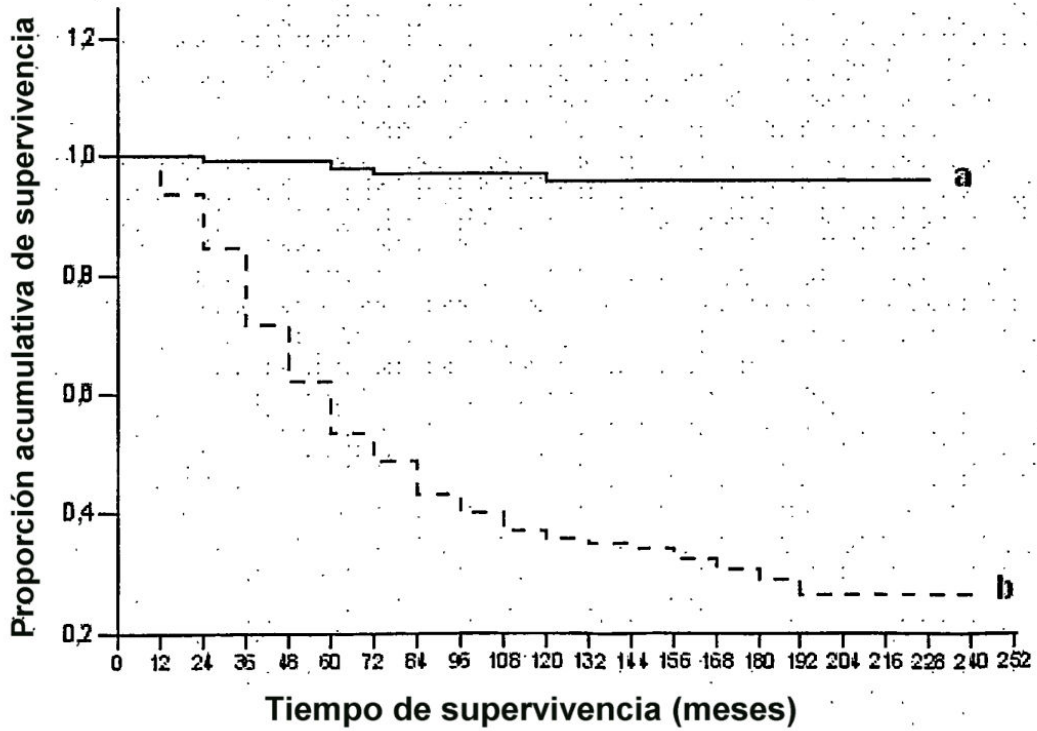


Figura 6

