

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 244**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2017** **E 21199551 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025** **EP 3954999**

54 Título: **Composiciones y métodos para detectar y tratar el cáncer ovárico**

30 Prioridad:

31.12.2015 EP 15307192

05.02.2016 EP 16305138

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

30.04.2025

73 Titular/es:

ECS-PROGASTRIN SA (100.00%)

Avenue du Grey 38 A

Lausanne 1004, CH

72 Inventor/es:

PRIEUR, ALEXANDRE

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 3 015 244 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para detectar y tratar el cáncer ovárico

5 **Introducción**

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

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

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

El diagnóstico clínico se basa en una biopsia, que habitualmente se lleva a cabo bajo escaneo de tomografía computerizada o ultrasonidos. El mal pronóstico de dicha enfermedad se debe en particular al diagnóstico tardío, debido en particular a la ausencia de signos y síntomas tempranos. Hasta el momento, no existen biomarcadores moleculares que se hayan traducido en una práctica clínica generalizada del cáncer ovárico (Kaz et al, Cancer Letters, 2014). Los tratamientos dependen del desarrollo del cáncer y entre ellos habitualmente se incluyen la cirugía, para tumores localizados pequeños, o la quimioterapia, posiblemente en combinación con la terapia de radiación.

Van Solinge et al. (Cancer Res. 1993, 53:1823-1828) divulgan un ensayo *in situ* de la expresión de la progastina mediante radioinmunoensayo (RIA) sobre secciones embebidas en parafina de tumores serosos ováricos. El documento WO 2011/083091 se refiere a métodos para tratar el cáncer pancreático con anticuerpos monoclonales antiprogastrina.

Por lo tanto, todavía existe una necesidad de métodos que permitan un diagnóstico rápido, fiable y eficaz en relación a costes del cáncer ovárico, ya que todavía existe una necesidad de nuevas composiciones y métodos para la prevención o el tratamiento del cáncer ovárico.

40 **Descripción**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualesquiera otros aspectos o formas de realización proporcionadas en la presente memoria se proporcionan a título exclusivamente informativo.

45 La presente invención proporciona un método para el diagnóstico *in vitro* del cáncer ovárico en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la muestra biológica del sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastina,
- 50 b) detectar la unión de la molécula de unión a progastina a la progastina en la muestra, en el que la unión indica la presencia del cáncer ovárico en el sujeto,

en el que la muestra biológica es seleccionada de entre: sangre, suero y plasma.

55 En una forma de realización, la etapa b) comprende además determinar la concentración de progastina y en la que una concentración de progastina de por lo menos 5 pM, por lo menos 10 pM, por lo menos 20 pM, por lo menos 30 pM o por lo menos 40 pM en la muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer ovárico en el sujeto.

60 En una forma de realización, el cáncer ovárico está metastatizado.

Preferentemente, el método de la invención comprende las etapas adicionales de:

- 65 c) determinar una concentración de referencia de progastina en una muestra de referencia, preferentemente una muestra biológica aislada de un sujeto sano,

d) comparar la concentración de progastrina en la muestra biológica con la concentración de referencia de progastrina,

e) determinar, a partir de la comparación de la etapa d), la presencia del cáncer ovárico.

En una forma de realización, está presente un cáncer ovárico si la concentración de progastrina en la etapa b) es superior a la concentración de referencia de progastrina en la etapa c).

En una forma de realización, el método comprende además una segunda prueba de diagnóstico de cáncer ovárico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere asimismo a un método de monitorización de la eficacia de un tratamiento para el cáncer ovárico en un paciente, que comprende las etapas de:

a) determinar la concentración de progastrina en una primera muestra biológica obtenida del paciente antes del tratamiento, que comprende:

poner en contacto la primera muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,

medir la unión de la molécula de unión a progastrina a la progastrina en la primera muestra; y

b) determinar la concentración de progastrina en una segunda muestra biológica obtenida del paciente tras el tratamiento, que comprende:

poner en contacto la segunda muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,

medir la unión de la molécula de unión a progastrina a la progastrina en la segunda muestra; y

c) comparar la concentración de progastrina de la etapa a) con la concentración de progastrina de la etapa b),

en el que una concentración de progastrina en la primera muestra superior a la concentración de progastrina en la segunda muestra indica que el tratamiento es eficaz; y

en el que la muestra biológica es seleccionada de entre: sangre, suero y plasma.

En una forma de realización, la molécula de unión a progastrina es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en la que el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las 6 CDR del anticuerpo a partir del cual deriva.

Preferentemente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es seleccionado en el grupo que consiste en:

- unos anticuerpos monoclonales que se unen a la región N-terminal de la progastrina, en el que la región N-terminal es representada preferentemente por SEC ID nº 2, y

- unos anticuerpos monoclonales que se unen a la región C-terminal de la progastrina, en el que la región C-terminal es representada preferentemente por SEC ID nº 3,

en el que el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las 6 CDR del anticuerpo a partir del cual deriva.

Más preferentemente, el anticuerpo que se une a la progastrina es un anticuerpo monoclonal seleccionado en el grupo que consiste en:

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, 8 y 9, respectivamente,

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, 14 y 15, respectivamente,

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una,

preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 19, 20 y 21, respectivamente,

5

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 25, 26 y 27, respectivamente,

10

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 28, 29 y 30, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 31, 32 y 33, respectivamente, y

15

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 34, 35 y 36, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 37, 38 y 39, respectivamente.

20

En una forma de realización, la unión de la molécula de unión a la progastrina se detecta y/o mide mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), transferencia western o inmunohistoquímica (IHC), preferentemente mediante ELISA o RIA, más preferentemente mediante ELISA.

25

En una forma de realización, la muestra biológica se pone en contacto con una primera molécula, que se une a una primera parte de la progastrina, y con una segunda molécula, que se une a una segunda parte de la progastrina.

30

A continuación, la presente divulgación proporciona métodos para el diagnóstico *in vitro* del cáncer ovárico, en el que dicho método comprende la detección de progastrina en una muestra biológica de un sujeto. Preferentemente, se determina la cantidad de progastrina en dicha muestra, permitiendo de esta manera la cuantificación de la progastrina. La presente divulgación, pero que no forma parte de la invención reivindicada, proporciona además una composición para la utilización en la prevención o el tratamiento del cáncer ovárico, en la que dicha composición comprende un anticuerpo de unión a la progastrina, y métodos para la prevención o el tratamiento del cáncer ovárico que comprenden la utilización de una composición que comprende un anticuerpo que se une a la progastrina, solo o en combinación con cualesquiera otros métodos preventivos o terapéuticos conocidos contra el cáncer ovárico.

35

40

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

45

50

Los anticuerpos monoclonales antiprogastrina humana (anti-hPG) y su utilización para el diagnóstico o la terapia se han descrito en los documentos siguientes: WO 2011/083 088 para el cáncer colorrectal, WO 2011/083 090 para el cáncer de mama, WO 2011/083 091 para el cáncer pancreático, WO 2011/116 954 para el cáncer colorrectal y gastrointestinal y WO 2012/013 609 y WO 2011/083089 para patologías hepáticas.

55

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para la evaluación *in vitro* del riesgo de presencia de cáncer ovárico, en el que dicho método comprende una etapa de detección de progastrina en una muestra biológica de un sujeto. La presencia de progastrina en la muestra indica que existe un riesgo de presencia de cáncer ovárico. Los presentes inventores han sido los primeros en mostrar que los niveles de progastrina están más elevados en los pacientes de cáncer ovárico que en sujetos sanos. En contraste, estudios anteriores han concluido que la significancia fisiológica de la expresión de gastrina ovárica resulta difícil de evaluar (von Solinge et al., Cancer Res., 53(8): 1823-1828, 1993).

60

De esta manera, en un primer caso, la divulgación se refiere a un método *in vitro* de evaluación del riesgo de presencia de cáncer ovárico en un sujeto, en el que dicho método comprende las etapas de:

65

- a) puesta en contacto de una muestra biológica de dicho sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, y
- b) detección de la unión de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina en dicha muestra, en la que dicha unión indica un riesgo de presencia de cáncer ovárico.

La unión de la molécula de unión a progastrina puede detectarse mediante diversos ensayos disponibles para el experto en la materia. Aunque son divulgados en la presente memoria cualesquiera medios adecuados para llevar a cabo los ensayos, puede mencionarse en particular FACS, ELISA, RIA, transferencia western e IHQ.

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

- a) puesta en contacto de dicha muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
- b) determinación de la concentración de progastrina en dicha muestra biológica, en la que una concentración de progastrina de por lo menos 5 pM en dicha muestra biológica es indicativa de un riesgo de presencia de cáncer ovárico.

Una vez se ha determinado la concentración de progastrina presente en la muestra, el resultado puede compararse con los de una o más muestras de control, que se obtienen de una manera similar a las muestras de ensayo, aunque de uno o más individuos que es conocido que no sufren de un cáncer ovárico. En el caso de que la concentración de progastrina sea significativamente más elevada en la muestra de ensayo, puede concluirse que existe una probabilidad incrementada de que el sujeto del que se ha obtenido presente un cáncer ovárico.

De esta manera, más preferentemente, el método dado a conocer en la presente memoria comprende las etapas adicionales de:

- c) determinación de una concentración de referencia de progastrina en una muestra de referencia,
- d) comparación de la concentración de progastrina en dicha muestra biológica con dicha concentración de referencia de progastrina,
- e) evaluación, a partir de la comparación de la etapa d), del riesgo de presencia de cáncer ovárico.

Según otro aspecto, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar cáncer ovárico en un sujeto, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) puesta en contacto de una muestra biológica de dicho sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, y
- b) detección de la unión de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina en dicha muestra, en la que dicha unión indica la presencia de cáncer ovárico en dicho sujeto.

Preferentemente, la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* de diagnóstico de cáncer ovárico en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a) puesta en contacto de dicha muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
- b) determinación del nivel o concentración de progastrina en dicha muestra biológica, en la que una concentración de progastrina de por lo menos 5 pM en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer ovárico en dicho sujeto.

Más específicamente, una concentración de progastrina de por lo menos 5 pM, 10 pM, por lo menos 20 pM, por lo menos 30 pM, en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer ovárico en dicho sujeto.

Más preferentemente, el método dado a conocer en la presente memoria comprende las etapas adicionales de:

- c) determinación de una concentración de referencia de progastrina en una muestra de referencia,
- d) comparación de la concentración de progastrina en dicha muestra biológica con dicho nivel o concentración de referencia de progastrina,
- e) diagnóstico, a partir de la comparación de la etapa d), de la presencia de cáncer ovárico.

Según otro aspecto, la divulgación se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar el cáncer ovárico metastatizado

en un sujeto, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) puesta en contacto de una muestra biológica de dicho sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, y
- b) detección de la unión de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina en dicha muestra, en la que dicha unión indica la presencia de cáncer ovárico metastatizado en dicho sujeto.

Un caso preferido de la presente divulgación se refiere a un método *in vitro* de diagnóstico de cáncer ovárico metastatizado en un sujeto, a partir de una muestra biológica de dicho sujeto, que comprende las etapas de:

- a) puesta en contacto de dicha muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
- b) determinación mediante un ensayo bioquímico del nivel o concentración de progastrina en dicha muestra biológica, en la que una concentración de progastrina por lo menos 5 pM superior en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer ovárico metastatizado en dicho sujeto.

Más específicamente, una concentración de progastrina de por lo menos 5 pM, 10 pM, por lo menos 20 pM, por lo menos 30 pM, por lo menos 40 pM o por lo menos 50 pM en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer ovárico metastatizado en dicho sujeto.

Más preferentemente, el método divulgado en la presente memoria preferentemente comprende las etapas adicionales de:

- c) determinación de una concentración de referencia de progastrina en una muestra de referencia,
- d) comparación de la concentración de progastrina en dicha muestra biológica con dicho nivel o concentración de referencia de progastrina,
- e) diagnóstico, a partir de la comparación de la etapa d), de la presencia de cáncer ovárico metastatizado.

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

Más específicamente, la muestra biológica de dicho sujeto se pone en contacto con por lo menos una molécula de unión a progastrina, en la que dicha molécula de unión a progastrina es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La expresión "evaluación del riesgo de presencia de cáncer ovárico en un sujeto" designa la determinación de una probabilidad relativa para un sujeto dado de sufrir de cáncer ovárico, en comparación con un sujeto o valor de referencia. Un método según la divulgación representa una herramienta en la evaluación de dicho riesgo, en combinación con otros métodos o indicadores, tales como el examen clínico, la biopsia y la determinación del nivel de un biomarcador conocido de cáncer ovárico.

En un caso específico, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de cáncer ovárico que comprende la determinación de la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto, en la que dicho sujeto muestra por lo menos un síntoma clínico de cáncer ovárico. Entre los síntomas clínicos del cáncer ovárico se incluyen la pérdida de peso, la deglución dolorosa o difícil, la tosa, la indigestión y el ardor de estómago.

En otro caso específico, la presente divulgación se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de cáncer ovárico que comprende la determinación de la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto, en la que dicho sujeto muestra por lo menos un síntoma clínico de cáncer y/o metástasis.

La expresión "diagnóstico *in vitro*" se refiere a determinar si un sujeto sufre de una afección particular.

Por lo tanto, un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer ovárico, tal como se da a conocer en la presente memoria, puede considerarse una herramienta dentro de un procedimiento de diagnóstico.

Un caso más particular de la presente divulgación se refiere a un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer ovárico en un sujeto, que comprende la determinación de la concentración de progastrina en dicha muestra biológica y la determinación de un biomarcador conocido de cáncer ovárico.

El término "progastrina" designa el péptido progastrina de mamífero, y particularmente la progastrina humana. A fin de evitar toda duda, sin ninguna especificación, la expresión "progastrina humana" se refiere a la PG humana de secuencia SEC ID nº 1. La progastrina humana comprende especialmente un dominio N-terminal y un dominio

C-terminal que no se encuentran presentes en las formas biológicamente activas de hormona gastrina indicadas anteriormente. Preferentemente, la secuencia de dicho dominio N-terminal se representa mediante la SEC ID nº 2. En otra forma de realización preferida, la secuencia de dicho dominio C-terminal se representa mediante la SEC ID nº 3.

5

La determinación de la concentración de progastrina, en un método dado a conocer en la presente memoria, se lleva a cabo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia de la bioquímica.

10

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

15

20

25

30

Al medir los niveles de expresión al nivel de proteínas, la medición especialmente puede llevarse a cabo utilizando moléculas específicas de unión a progastrina, tales como, por ejemplo, anticuerpos, en particular utilizando técnicas bien conocidas, tales como la tinción de membrana celular con biotilación u otras técnicas equivalentes, seguidas de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos, transferencia western, ELISA o ELISPOT, ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia (IF), micromatrices de anticuerpos o micromatrices de tejidos acopladas con inmunohistoquímica. Entre otras técnicas adecuadas se incluyen FRET o BRET, métodos microscópicos o histoquímicos de células individuales utilizando una o múltiples longitudes de onda de excitación y aplicando cualquiera de los métodos ópticos adaptados, tales como métodos electroquímicos (técnicas de voltametría y amperometría), microscopía de fuerza atómica y métodos de radiofrecuencia, por ejemplo, espectroscopía de resonancia multipolar, detección confocal y no confocal de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia del plasmón superficial, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de rejilla acopladora de guía de ondas o interferometría), ELISA celular, citometría de flujo, obtención de imágenes de resonancia magnética radioisotópica, análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), HPLC-espectroscopía de masas, cromatografía líquida/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS/MS). La totalidad de dichas técnicas son bien conocidas de la técnica y no necesitan detallarse adicionalmente en la presente memoria. Dichas diferentes técnicas pueden utilizarse para medir los niveles de progastrina.

35

Dicho método puede seleccionarse en particular de entre: un método basado en la inmunodetección, un método basado en la transferencia western, un método basado en la espectrometría de masas, un método basado en la cromatografía y un método basado en la citometría de flujo. Aunque cualesquiera medios adecuados para llevar a cabo los ensayos se encuentran incluidos en la divulgación, métodos tales como FACS, ELISA, RIA, transferencia western e IHQ resultan particularmente útiles para llevar a cabo el método de la divulgación.

40

Un ejemplo más particular de un método para el diagnóstico *in vitro* del cáncer ovárico dado a conocer en la presente memoria comprende poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con una molécula de unión a progastrina utilizando un ensayo inmunoenzimático, preferentemente basándose en técnicas seleccionadas de entre RIA y ELISA.

45

50

55

Una "muestra biológica" tal como se utiliza en la presente memoria es una muestra de tejido o líquido biológico que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos, por ejemplo, de una proteína, polinucleótido o transcrito del cáncer ovárico. Dicha muestra debe permitir la determinación de los niveles de expresión de la progastrina. La progastrina es conocido que es una proteína secretada. De esta manera, entre las muestras biológicas preferidas para la determinación del nivel de proteína progastrina se incluyen líquidos biológicos. Un "líquido biológico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier líquido que incluye material de origen biológico. Entre los líquidos biológicos preferidos para la utilización en los presentes métodos se incluyen líquidos corporales de un animal, por ejemplo, un mamífero, preferentemente un sujeto humano. El líquido corporal puede ser cualquier líquido corporal, incluyendo, aunque sin limitación, sangre, plasma, suero, linfa, líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, sudor y orina. Preferentemente, dichas muestras biológicas líquidas preferidas incluyen muestras tales como una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero. Más preferentemente, la muestra biológica es una muestra de sangre. En efecto, dicha muestra de sangre puede obtenerse mediante una extracción de sangre completamente inofensiva del paciente y, de esta manera, permite una evaluación no invasiva de los riesgos de que el sujeto desarrolle un tumor.

60

65

Una "muestra biológica" tal como se utiliza en la presente memoria incluye además una muestra de cáncer sólida del paciente que debe someterse a ensayo, en el caso de que el cáncer sea un cáncer sólido. Dicha muestra de cáncer sólida permite al experto en la materia realizar cualquier tipo de medición del nivel del biomarcador de la divulgación. En algunos casos, los métodos divulgados en la presente memoria pueden comprender además una etapa preliminar de obtener una muestra de cáncer sólida del paciente. La expresión "muestra de cáncer sólida" se refiere a una muestra de tejido tumoral. Incluso en un paciente canceroso, el tejido que es el sitio del tumor todavía comprende tejido sano no tumoral. La "muestra de cáncer", de esta manera, debería limitarse a tejido tumoral obtenido del paciente. Dicha "muestra de cáncer" puede ser una muestra de biopsia o una muestra obtenida de una terapia de resección quirúrgica.

5 Típicamente se obtiene una muestra biológica de un organismo eucariota, más preferentemente un mamífero, o un ave, reptil o pez. En efecto, un "sujeto" que puede someterse al método descrito en la presente memoria puede ser cualquier animal mamífero, incluyendo el ser humano, el perro, el gato, la vaca, la cabra, el cerdo, el puerco, la oveja y el mono, o un ave, reptil o pez. Preferentemente, el sujeto es un ser humano; el sujeto humano puede conocerse como "paciente".

10 La expresión "obtención de una muestra biológica" en la presente memoria se refiere a obtener una muestra biológica para la utilización en métodos descritos en la presente memoria. Con más frecuencia, lo anterior se lleva a cabo extrayendo una muestra de células de un animal, aunque asimismo puede llevarse a cabo mediante la utilización de células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas de otra persona, en otro tiempo y/o con otro fin) o mediante la realización de los presentes métodos in vivo. Los tejidos de archivo, que presentan una historia de tratamiento o de resultado, resultarán particularmente útiles.

15 Dicha muestra puede obtenerse y, en caso necesario, prepararse, según métodos conocidos por el experto en la materia. En particular, es bien conocido en la técnica que la muestra debe obtenerse de un sujeto en ayuno.

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

25 Preferentemente, el riesgo de que dicho sujeto sufra de cáncer ovárico se determina mediante comparación del nivel de progastrina medido en dicha muestra biológica con un nivel de referencia.

30 La expresión "nivel de referencia", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al nivel de expresión del marcador de cáncer ovárico bajo consideración, es decir, progastrina, en una muestra de referencia. Una "muestra de referencia", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra obtenida de sujetos, preferentemente dos o más individuos, que es conocido que están libres de la enfermedad, o alternativamente, de la población general. Los niveles de expresión de referencia adecuados de progastrina pueden determinarse mediante medición de los niveles de expresión de dicho marcador en varios sujetos adecuados, y dichos niveles de referencia pueden ajustarse a poblaciones de sujetos específicas. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que presenta un límite superior o inferior, un intervalo de valores, un valor medio, un valor de mediana, o un valor comparado con un valor de control o línea base particular. El valor de referencia puede estar basado en el valor de una muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se somete a ensayo, aunque en un punto temporal anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como de una población de sujetos del grupo de edad cronológica correspondiente, o basarse en un grupo de muestras que incluye o que excluye la muestra que debe someterse a ensayo.

45 Ventajosamente, un "nivel de referencia" es un nivel de progastrina predeterminado, obtenido de una muestra biológica de un sujeto con un estado particular conocido con respecto al cáncer. En casos particulares, el nivel de referencia utilizado para la comparación con la muestra de ensayo en la etapa (b) puede haberse obtenido de una muestra biológica de un sujeto sano, o de una muestra para ensayo de un sujeto que sufre de cáncer; se entiende que el perfil de expresión de referencia asimismo puede obtenerse de un grupo de muestras biológicas de sujetos sanos o de un grupo de muestras de sujetos que presentan cáncer.

50 En un ejemplo particular, la muestra de referencia se recoge de sujetos exentos de cualquier cáncer y preferentemente de cualquier patología. Debe entenderse que, según la naturaleza de la muestra biológica recogida de un paciente, la muestra de referencia será una muestra biológica de la misma naturaleza que dicha muestra biológica.

55 El nivel de progastrina se determina en el presente método mediante la determinación de la cantidad de progastrina que se encuentra unida a una molécula de unión a progastrina, preferentemente a un anticuerpo que reconoce la progastrina.

60 La expresión "molécula de unión a progastrina" en la presente memoria se refiere a cualquier molécula que se une a la progastrina pero que no se une a la gastrina-17 (G17), gastrina-34 (GS34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly). La molécula de unión a progastrina divulgada en la presente memoria puede ser cualquier molécula de unión a progastrina, tal como, por ejemplo, una molécula de anticuerpo o una molécula de receptor. Preferentemente, la molécula de unión a progastrina es un anticuerpo antiprogastrina o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La expresión "de unión", "se une" o similar, significa que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, forma un complejo con un antígeno que, bajo condiciones fisiológicas, es relativamente estable. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen son bien conocidos en la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la diálisis de equilibrio, la resonancia del plasmón superficial, y similares. En una forma de realización particular, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une a progastrina con una afinidad que es por lo menos dos veces superior a su afinidad para la unión a una molécula no específica, tal como BSA o caseína. En una forma de realización más particular, dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une únicamente a progastrina.

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

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

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria pretende incluir anticuerpos policlonales y monoclonales. Un anticuerpo (o "inmunoglobulina") consiste en una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región (o dominio) variable de cadena pesada (abreviado en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviado en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio: CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables", que son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno y que se encuentran entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). El método para identificar las CDR dentro de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo y para determinar su secuencia son bien conocidos por el experto en la materia. A fin de evitar toda duda, en ausencia de cualquier indicación en el texto en sentido contrario, la expresión CDR se refiere a las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo según define IMGT, en las que la numeración única de IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco y de las regiones determinantes de complementariedad, CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2.

La numeración única de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables, con independencia del receptor de antígeno, del tipo de cadena o de la especie [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509, 1997 / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136, 1999 / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77, 2003]. En la numeración única IMGT, los aminoácidos conservados siempre presentan la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1st-CYS), triptófano 41 (CONSERVED-TRP), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2nd-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única de IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones marco (FR1-IMGT, posiciones 1 a 26; FR2IMGT: 39 a 55; FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Como los huecos representan las posiciones no ocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre paréntesis y separadas por puntos, por ejemplo, [8.8.13]) se convierten en información crucial. La numeración única IMGT se utiliza en representaciones gráficas 2D, designadas como IMGT "Colliers de Perles" [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883, 2002 / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30, 2007], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210, 2004].

Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo aminoterminal a extremo carboxiterminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Los anticuerpos pueden ser de diferente isotipo (es decir, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM).

En una forma de realización más particular, dicho anticuerpo de unión a progastrina, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos policlonales, anticuerpos

monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos camelizados, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.

5 Un "anticuerpo policlona" es un anticuerpo que ha sido producido entre o en presencia de otro u otros anticuerpos no idénticos. En general, se producen anticuerpos policlonales a partir de un linfocito B en presencia de varios otros linfocitos B productores de anticuerpos no idénticos. Habitualmente se obtienen anticuerpos policlonales directamente de un animal inmunizado.

10 La expresión "anticuerpo monoclonal" designa un anticuerpo que aparece a partir de una población de anticuerpos prácticamente homogénea, en la que la población comprende anticuerpos idénticos excepto por unas cuantas posibles mutaciones naturales que pueden observarse en proporciones mínimas. Un anticuerpo monoclonal aparece a partir del crecimiento de un único clon celular, tal como un hibridoma, y se caracteriza por cadenas pesadas de una clase y subclase, y cadenas ligeras de un tipo.

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

30 De acuerdo con la divulgación, pero sin formar parte de la invención reivindicada, dicho fragmento de unión a antígeno comprende por lo menos una CDR del anticuerpo del que se deriva. De acuerdo adicionalmente con la divulgación, pero sin formar parte de la invención reivindicada, dicho fragmento de unión a antígeno comprende 2, 3, 4 o 5 CDR. De acuerdo con la invención reivindicada, dicho fragmento de unión a antígeno comprende las 6 CDR del anticuerpo del que se deriva.

35 Los "fragmentos de unión a antígeno" pueden seleccionarse, aunque sin limitación, de entre el grupo que consiste en los fragmentos Fv, scFv ('sc' es cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o proteínas de fusión con péptidos desordenados, tales como XTEN (polipéptido recombinante extendido) o motivos PAS, o cualquier fragmento del que la semivida resultaría incrementada mediante modificación química, tal como la adición de poli(etilén)glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG", por polietilenglicol), o mediante incorporación en un liposoma, en el que dichos fragmentos
 40 presentan por lo menos una de las CDR características del presente anticuerpo. Preferentemente, dichos "fragmentos de unión a antígeno" estará constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del que se derivaron, en el que dicha secuencia parcial resulta suficiente para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo del que proceden y una afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, en un modo más preferido por lo menos igual a 1/10, de la afinidad del anticuerpo del que procede, con respecto a la diana.

50 En otro caso particular del método de diagnóstico del cáncer ovárico, se pone en contacto una muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo de unión a progastрина, en el que dicho anticuerpo se ha obtenido mediante un método de inmunización conocido por el experto en la materia, en el que se utiliza como inmunógeno un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende la totalidad o una parte de la secuencia de aminoácidos de la progastрина. Más particularmente, dicho inmunógeno comprende un péptido seleccionado de entre:

- 55 – un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de la progastрина de longitud completa, y particularmente la progastрина humana de longitud completa de SEC ID nº 1,
- 60 – un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte de la secuencia de aminoácidos de la progastрина de longitud completa, y particularmente la progastрина humana de longitud completa de SEC ID nº 1,
- 65 – un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte o a la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de la progastрина, y en particular, péptidos que comprenden, o que consisten en, la secuencia de aminoácidos: SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID nº 2), y

ES 3 015 244 T3

- un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte o a la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la progastrina, y en particular, péptidos que comprenden, o que consisten en, la secuencia de aminoácidos: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEC ID nº 3),
- 5
- un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte de la secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la progastrina, y en particular, péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos FGRRSAEDEN (SEC ID nº 40) correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de la progastrina.

10 El experto en la materia conocerá que dicha inmunización puede utilizarse para generar anticuerpos policlonales o monoclonales, según se desee. Los métodos para obtener cada uno de dichos tipos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. De esta manera, el experto en la materia seleccionará fácilmente un método para generar anticuerpos policlonales y/o monoclonales contra cualquier antígeno dado.

15 Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales que se generan mediante la utilización de un inmunógeno que comprende la secuencia de aminoácidos "SWKPRSQQPDAPLG", correspondiente a la secuencia de aminoácidos 1-14 de la progastrina humana (extremo N-terminal) se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los anticuerpos monoclonales designados como: mAb3, mAb4, mAb16, and mAb19 y mAb20, tal como se indica en las tablas 1 a 4, a continuación. Se han descrito otros anticuerpos monoclonales, aunque no está claro si estos anticuerpos se unen realmente a la progastrina (documento WO 2006/032980). Los resultados experimentales de mapeado de epítomos muestran que mAb3, mAb4, mAb16 y mAb19 y mAb20 se unen específicamente a un epítomo dentro de dicha secuencia de aminoácidos N-terminal de hPG. Los anticuerpos policlonales que reconocen específicamente un epítomo dentro del extremo N-terminal de la progastrina representada mediante la SEC ID nº 2, han sido descritos en la técnica (ver, por ejemplo, el documento WO 2011/083088).

25 Tabla 1

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEC ID nº
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYIFTSYW	SEC ID nº 4
		VH CDR 2	FYPGNSDS	SEC ID nº 5
		VH CDR 3	TRRDSPQY	SEC ID nº 6
		VL CDR 1	QSIVHSHNGNTY	SEC ID nº 7
		VL CDR 2	KVS	SEC ID nº 8
		VL CDR 3	FQGSHVPFT	SEC ID nº 9

Tabla 2

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEC ID nº
20D2C3G2	mAb4	VH CDR 1	GYTFSSW	SEC ID nº 10
		VH CDR 2	FLPGSGST	SEC ID nº 11
		VH CDR 3	ATDGNYDWFAY	SEC ID nº 12
		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	SEC ID nº 13
		VL CDR 2	KVS	SEC ID nº 14
		VL CDR 3	SQSTHVPPT	SEC ID nº 15

30

Tabla 3

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEC ID nº
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYTFTSY Y	SEC ID nº 16
		VH CDR 2	INPSNGGT	SEC ID nº 17
		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	SEC ID nº 18
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	SEC ID nº 19
		VL CDR 2	LVS	SEC ID nº 20
		VL CDR 3	WQGT HSPYT	SEC ID nº 21

Tabla 4

35

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEC ID nº
1B3B4F11	mAb19	VH CDR 1	GYSITSDYA	SEC ID nº 22
		VH CDR 2	ISFSGYT	SEC ID nº 23
		VH CDR 3	AREVNYGDSYHFDY	SEC ID nº 24
		VL CDR 1	SQHRTYT	SEC ID nº 25
		VL CDR 2	VKKD GSH	SEC ID nº 26
		VL CDR 3	GVD A IKGQSVFV	SEC ID nº 27

ES 3 015 244 T3

Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden generarse mediante la utilización de un inmunógeno que comprende la secuencia de aminoácidos "QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN" (parte C-terminal de la progastrina) correspondiente a la secuencia de aminoácidos 55-80 de la progastrina humana se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los anticuerpos designados como: mAb8 y mAb13, en las tablas 5 y 6. Los resultados experimentales de mapeado de epítomos muestran que mAb13 se unen específicamente a un epítomo dentro de dicha secuencia de aminoácidos C-terminal de hPG.

Tabla 5

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEC ID nº
1C10D3B9	mAb8	VH CDR 1	GFTFTTYA	SEC ID nº 28
		VH CDR 2	ISSGGTYT	SEC ID nº 29
		VH CDR 3	ATQGNYSLDF	SEC ID nº 30
		VL CDR 1	KSLRHTKGITF	SEC ID nº 31
		VL CDR 2	QMS	SEC ID nº 32
		VL CDR 3	AQNLELPLT	SEC ID nº 33

Tabla 6

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEC ID nº
2C6C3C7	mAb13	VH CDR 1	GFIFSSYG	SEC ID nº 34
		VH CDR 2	INTFGDRT	SEC ID nº 35
		VH CDR 3	ARGTGTY	SEC ID nº 36
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	SEC ID nº 37
		VL CDR 2	LVS	SEC ID nº 38
		VL CDR 3	WQGTHFPQT	SEC ID nº 39

Entre otros ejemplos se incluyen anticuerpos monoclonales y/o policlonales anti-hPG generados mediante la utilización de un inmunógeno que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 40.

En un caso más particular del presente método, dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo anti-hPG o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo anti-hPG se selecciona de entre los anticuerpos anti-hPG N-terminales y los anticuerpos anti-hPG C-terminales.

Las expresiones "anticuerpos anti-hPG N-terminales" y "anticuerpos anti-hPG C-terminales" designan anticuerpos que se unen a un epítomo que comprende los aminoácidos situados en la parte N-terminal de hPG o a un epítomo que comprende aminoácidos situados en la parte C-terminal de hPG, respectivamente. Preferentemente, la expresión "anticuerpos anti-hPG N-terminales" se refiere a anticuerpos de unión a un epítomo situado en un dominio de la progastrina cuya secuencia se representa mediante la SEC ID nº 2. En otro caso preferido, la expresión "anticuerpos anti-hPG C-terminales" se refiere a anticuerpos de unión a un epítomo situado en un dominio de la progastrina cuya secuencia se representa mediante la SEC ID nº 3.

El término "epítomo" se refiere a una región de un antígeno que se une a un anticuerpo. Los epítomos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítomos funcionales son generalmente un subgrupo de los epítomos estructurales y presentan aquellos aminoácidos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítomos asimismo pueden ser conformacionales. En determinadas formas de realización, los epítomos pueden incluir determinantes que son agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales sacáridas, grupos fosforilo o grupos sulfonilo, y en determinadas formas de realización, pueden presentar características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. La determinación del epítomo al que se une un anticuerpo puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica de mapeado de epítomos, conocida por el experto en la materia. Un epítomo puede comprender diferentes aminoácidos, que se localizan secuencialmente dentro de la secuencia de aminoácidos de una proteína. Un epítomo puede comprender además aminoácidos, que no se localizan secuencialmente dentro de la secuencia de aminoácidos de una proteína.

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

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos un, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente de 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9, respectivamente, o secuencias con una identidad de

por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9, respectivamente;

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

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, el "porcentaje de identidad" o "% de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se refiere al porcentaje de nucleótidos o residuos aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que deben compararse, obtenido después de la alineación óptima, en el que este porcentaje es puramente estadístico y en el que las diferencias están distribuidas entre las dos secuencias aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos tradicionalmente se lleva a cabo mediante la comparación de las secuencias después de haberlas alineado óptimamente, pudiendo llevar a cabo dicha comparación por segmento o mediante la utilización de una "ventana de alineación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de comparando manualmente, mediante métodos conocidos por el experto en la materia.

65 Para la secuencia de aminoácidos que muestra una identidad de por lo menos 80%, preferentemente de 85%, 90%, 95% y 98% respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia, entre los ejemplos preferidos se incluyen

los que contienen la secuencia de referencia, determinadas modificaciones, especialmente una delección, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, el truncado o la extensión. En el caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, resultan preferidas las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se sustituyen por aminoácidos "equivalentes". En la presente memoria, la expresión "aminoácidos equivalentes" pretende indicar cualesquiera aminoácidos que es probable que sean sustituidos por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, sin embargo, las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y los de ejemplos específicos definidos posteriormente.

Pueden determinarse los aminoácidos equivalentes basándose en su homología estructural con los aminoácidos a los que sustituyen o en los resultados de ensayos comparativos de actividad biológica entre los diversos anticuerpos que es probable que se generen.

En otro caso particular, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano; las demás partes de la molécula de anticuerpo se derivan de uno o varios anticuerpos humanos. Además, algunos de los residuos de segmento esquelético (denominados FR, por marco) pueden modificarse para conservar la afinidad de unión, según técnicas conocidas por el experto en la materia (Jones et al., Nature 321:522-525, 1986). El objetivo de la humanización es la reducción de la inmunogenicidad de un anticuerpo xenógeno, tal como un anticuerpo murino, para la introducción en un ser humano, manteniendo simultáneamente la afinidad de unión y especificidad de antígeno completas del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados divulgados en la presente memoria o fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante técnicas conocidas por el experto en la materia (tales como, por ejemplo, los indicados en los documentos Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992). Dichos anticuerpos humanizados resultan preferidos para su utilización en métodos que implican diagnósticos *in vitro* o el tratamiento preventivo y/o terapéutico *in vivo*. Otras técnicas de humanización asimismo son conocidas por el experto en la materia. En efecto, los anticuerpos pueden humanizarse utilizando una diversidad de técnicas, incluyendo el injerto de CDR (documentos EP 0 451 261; EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647, patentes US nº 5.530.101, US nº 6.180.370, US nº 5.585.089, US nº 5.693.761, US nº 5.639.641, US nº 6.054.297, US nº 5.886.152 y US nº 5.877.293), recubrimiento o resuperficialización (documentos EP 0 592 106 y EP 0 519 596; Padlan E. A., Molecular Immunology 28(4/5): 489-498, 1991; Studnicka G. M. et al., Protein Engineering 7(6): 805-814, 1994 Roguska M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 91:969-973, 1994), y reorganización de cadenas (patente US nº 5.565.332. Pueden producirse anticuerpos humanos utilizando una diversidad de técnicas conocidas de la técnica, incluyendo métodos de expresión fágica. Ver asimismo las patentes US nº 4.444.887, nº 4.716.111, nº 5.545.806 y nº 5.814.318, y las solicitudes publicadas de patente internacional WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

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

- un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos un, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente de 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9, respectivamente;
- un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos un, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 10, nº 11 y nº 12, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente de 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 10, nº 11 y nº 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, nº 14 y nº 15, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 13, nº 14 y nº 15, respectivamente;
- un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos un, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 16, nº 17 y nº 18, respectivamente, o secuencias con una identidad

de por lo menos 80%, preferentemente de 85%, 90%, 95% y 98% tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 16, nº 17 y nº 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 19, nº 20 y nº 21, respectivamente, o secuencias con una identidad de por lo menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98%, tras la alineación óptima con las secuencias SEC ID nº 19, nº 20 y nº 21, respectivamente;

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

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

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

en las que dicho anticuerpo comprende además regiones constantes de la cadena ligera y de la cadena pesada derivada de un anticuerpo humano.

En un primer caso, un método divulgado en la presente memoria comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-hPG de unión a un epítipo de hPG, en el que dicho epítipo está localizado dentro de la parte C-terminal de hPG o con un epítipo localizado dentro de la parte N-terminal de hPG.

En un caso más específico, un método divulgado en la presente memoria comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-hPG de unión a un epítipo de hPG, en el que dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de la progastrina seleccionada de entre una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 10 a 14 de hPG, los aminoácidos 9 a 14 de hPG, los aminoácidos 4 a 10 de hPG, los aminoácidos 2 a 10 de hPG y los aminoácidos 2 a 14 de hPG, en el que la secuencia de aminoácidos de hPG es SEC ID nº 1.

En un caso más específico, un método divulgado en la presente memoria comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo anti-hPG de unión a un epítipo de hPG, en el que dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la progastrina seleccionada de entre una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 71 a 14 de hPG, los aminoácidos 69 a 73 de hPG, los aminoácidos 71 a 80 de hPG, los aminoácidos 76 a 80 de hPG y los aminoácidos 67 a 74 de hPG, en el que la secuencia de aminoácidos de hPG es SEC ID nº 1.

En un primer caso, una composición divulgada en la presente memoria comprende un anticuerpo que reconoce un epítipo que incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la progastrina.

En un caso más específico, una composición dada a conocer en la presente memoria comprende un anticuerpo que reconoce un epítipo de la progastrina, en la que dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de la progastrina, en la que dicha

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

5 En un caso más específico, una composición dada a conocer en la presente memoria comprende un anticuerpo que reconoce un epítipo de la progastrina, en la que dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la progastrina, en la que dicha secuencia de aminoácidos puede incluir los residuos 71 a 74 de hPG, los residuos 69 a 73 de hPG, los residuos 71 a 80 de hPG (SEC ID nº 40), los residuos 76 a 80 de hPG o los residuos 67 a 74 de hPG, en el que la secuencia de aminoácidos de hPG es SEC ID nº 1.

10 En un caso particular, dicho método comprende una etapa de poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con una primera molécula que se une a una primera parte de la progastrina y con una segunda molécula que se une a una segunda parte de la progastrina. En una forma de realización más particular, en la que dicha molécula de unión a progastrina es un anticuerpo, una muestra biológica de un sujeto se pone en contacto con un anticuerpo que se une a un primer epítipo de la progastrina y con un segundo anticuerpo que se une a un segundo epítipo de la progastrina.

15 Preferentemente, el presente método para el diagnóstico del cáncer ovárico comprende la detección de la progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano.

Más preferentemente, el presente método para el diagnóstico del cáncer ovárico comprende la detección de la concentración de la progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano.

20 En otro caso particular, el presente método para el diagnóstico del cáncer ovárico comprende la detección de la concentración de la progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano, en la que dicha muestra biológica se selecciona de entre sangre, suero y plasma.

25 Todavía más preferentemente, el presente método comprende poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como se ha indicado anteriormente, en el que la unión de dicho anticuerpo anti-hPG en la muestra indica la presencia de cáncer ovárico en dicho sujeto.

30 Más particularmente, el presente método comprende poner en contacto la muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como se ha indicado anteriormente, en el que una concentración de progastrina superior a 5 pM en dicha muestra es indicativa de la presencia de cáncer ovárico en dicho sujeto.

35 Más preferentemente, el presente método comprende poner en contacto la muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como se ha indicado anteriormente, en el que una concentración de progastrina superior a 5 pM, 10 pM, 20 pM, 30 pM o 40 pM en dicha muestra es indicativa de la presencia de cáncer ovárico en dicho sujeto.

40 Todavía más preferentemente, el presente método comprende poner en contacto una muestra de dicho sujeto con un anticuerpo anti-hPG tal como se ha indicado anteriormente, en el que una concentración de progastrina superior a 5 pM, 10 pM, 20 pM, 30 pM o 40 pM en dicho plasma es indicativa de la presencia de cáncer ovárico metastatizado en dicho sujeto.

45 La presente divulgación se refiere además a métodos para monitorizar la eficacia de un tratamiento para el cáncer ovárico en un paciente, tal como quimioterapia, terapia biológica, inmunoterapia o terapia de anticuerpos, mediante la determinación de la concentración de progastrina en una primera muestra, tal como un líquido corporal o biopsia de cáncer ovárico, obtenida de un paciente antes del tratamiento para cáncer ovárico, y después comparar la concentración de progastrina en la primera muestra con la de una segunda muestra obtenida del mismo paciente después el tratamiento, en el que una reducción de la concentración de progastrina en dicha segunda muestra en comparación con dicha primera muestra indica que el tratamiento ha resultado eficaz.

50 En un caso particular, un método según la divulgación comprende comparar la concentración de progastrina en una muestra biológica obtenida de un paciente con un valor predeterminado de concentración de progastrina en la muestra, en una forma de realización más particular, dicho valor predeterminado se selecciona de entre: una media, o promedio, de valores de la muestra basados en la media, o promedio, la determinación del valor en una población libre de cáncer ovárico, un valor de concentración de progastrina obtenido en el caso de que se conozca que el paciente está libre de cáncer ovárico.

55 En un caso particular, un método divulgado en la presente memoria para el diagnóstico *in vitro* de cáncer ovárico comprende la determinación de la concentración de progastrina en una muestra de dicho paciente y un segundo ensayo diagnóstico de cáncer ovárico. Más particularmente, un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer ovárico divulgado en la presente memoria comprende la determinación de la concentración de progastrina en una muestra de dicho paciente y un segundo ensayo diagnóstico de cáncer ovárico, en el que:

En un caso particular, un método divulgado en la presente memoria comprende la determinación del nivel de progastrina con el tiempo en muestras de un paciente que ha sido o está siendo tratado para cáncer ovárico.

5 **Leyendas de figuras**

Figura 1: mediana de concentración plasmática de progastrina en pacientes de cáncer ovárico (n=8) y en pacientes de control (n=103).

10 Figura 2: recuentos celulares para células SK-OV-3 tras el tratamiento durante 48 h con 20 µg/ml de anticuerpos de control humanizados (anti-FcG1 humano de BioXCell)(CT Hz) o con 20 µg/ml de anti-hPG Hz (PG Hz) - prueba t de dos colas, *p<0.05.

15 Figura 3: número de esferas de SK-OV-3 formadas tras el tratamiento con control (CT Hz) o anticuerpo anti-PG humanizado (PG Hz) bajo condiciones de adherencia ultrabaja - prueba t de dos colas, ***p<0.001.

Ejemplos

Ejemplo 1: detección de concentración plasmática de progastrina utilizando anticuerpos policlonales

20 Se cuantificó el nivel plasmático de progastrina mediante ELISA a través de la utilización de dos anticuerpos antiprogastrina específicos: los anticuerpos de captura se utilizaron para recubrir los pocillos de la placa, mientras que los anticuerpos de revelado se utilizaron para detectar la progastrina y mediar en el revelado de la señal.

25 En el presente ejemplo, la cuantificación se basó en el método de ELIAS, que permite, mediante la utilización de un sustrato cuya reacción emite luz, asignar un valor proporcionar al nivel de luminiscencia de los anticuerpos unidos al antígeno retenido por los anticuerpos de captura.

Material

30 Los reactivos y aparatos se indican en la tabla 7.

Tabla 7

Designación	Proveedor	Referencia
placas MaxiSORP blancas Nunc, 96 pocillos	Dutscher	nº 055221
Carbonato/bicarbonato sódico	Sigma	nº 21851
DPBS 1X	Lonza	nº P04-36500
Tween-20	Biosolve	nº 20452335
BSA	Euromedex	nº 04-100-810-C
Estreptavidina-HRP	Pierce (Thermo)	nº 21130
sustrato de máxima sensibilidad para ELISA SuperSignal Femto	Pierce (Thermo)	nº 37074
anticuerpo policlonal antiprogastrina	Eurogentec	/

35 Se obtuvieron anticuerpos policlonales mediante inmunización de un conejo con progastrina N-terminal (SEC ID nº 2) o con progastrina C-terminal correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de hPG y que presentaba la secuencia FGRRSAEDEN (SEC ID nº 40) según protocolos estándares.

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

45 Se recubrieron placas de 96 pocillos mediante la preparación de una solución de carbonato-bicarbonato sódico, 50 mM, pH 9.6, mediante disolución del contenido de una cápsula en 100 ml de agua MilliQ. Se preparó en tampón de carbonato una solución de anticuerpo de captura (3 µg/ml), correspondiente a los anticuerpos policlonales obtenidos mediante la utilización del fragmento C-terminal de progastrina FGRRSAEDEN (SEC ID nº 40). Se añadieron 100 microlitros de solución de anticuerpos a cada pocillo y se incubaron a 4°C durante 16 horas (1 noche). A continuación, se bloquearon las placas mediante eliminación de la solución de anticuerpos y lavado 3 veces con 300 µl de 1X PBS/Tween-20 al 0.1%, seguido de la adición de 200 µl de tampón de bloqueo (1X PBS/Tween-20 al 0.1%/BSA al 0.1%) en cada pocillo y se incubó durante 2 horas a 22°C. A continuación, se eliminó el tampón de bloqueo y se lavaron los pocillos 3 veces con 300 µl de 1X PBS/Tween-20 al 0.1%.

50 La dilución del plasma se llevó a cabo de la manera siguiente: el plasma se utilizó puro, diluido 172, 1/5 y 1/10. Se prepararon diluciones a partir de plasma puro en 1X PBS/Tween-20 al 0.1%/BSA al 0.1%.

55 Para el ensayo de control, ELISA en presencia de una concentración conocida de progastrina, se preparó una

dilución de progastrina de la manera siguiente: se preparó PG recombinante patrón (progastrina humana de longitud completa producida en *E. coli* y purificada por afinidad con glutatión-agarosa/eliminación de la etiqueta (Tev)/purificación/diálisis mediante IMAC Counter, de Institut Pasteur, Paris, Francia) a una concentración de 0.45 mg/ml (45 μ M), por triplicado. Se prepararon intervalos de concentración de progastrina, de la manera siguiente:

- 5
- Solución A: predilución 1/10, 2 μ l de solución madre + 18 μ l de tampón
- Solución B: predilución 1/100, 10 μ l de A + 90 μ l de tampón
- 10
- Solución C: predilución 1/1000, 10 μ l de B + 90 μ l de tampón
- Solución D: 500 pM, 5,55 μ l de C + 494,5 μ l del diluyente
- Solución E: 250 pM, 250 μ l de D + 250 μ l del diluyente
- Solución F: 100 pM, 200 μ l de E + 300 μ l del diluyente
- Solución G: 50 pM, 250 μ l de F + 250 μ l del diluyente
- 15
- Solución H: 25 pM, 200 μ l de G + 200 μ l del diluyente
- Solución I: 10 pM, 100 μ l de H + 150 μ l del diluyente

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

20 Para la preparación de muestras de ensayo, se apartaron aproximadamente 500 μ l de cada muestra y se almacenaron hasta el análisis (y confirmación, en caso necesario) de los resultados. Se sometieron a ensayo 100 μ l de cada punto del intervalo y/o plasmas puros, diluidos a 1/2, 1/5 y 1/10, y se incubaron durante 2 horas a 22°C en las placas.

25 Para el revelado del ensayo, las placas se lavaron 3 veces con 300 μ l de 1X PBS/Tween-20 al 0.1%. Se preparó una solución del anticuerpo policlonal de conejo antiprogastrina, en el que dichos anticuerpos se habían obtenido mediante la utilización de la parte N-terminal de la progastrina como inmunógeno, acoplado con biotina a razón de 0.5 μ g/ml, mediante dilución en 1X PBS/Tween-20 al 0.1%/BSA al 0.1%. Se añadieron 100 μ l de dicha solución a cada pocillo. La incubación tuvo lugar durante 1 hora a 22°C. El revelado con estreptavidina-HRP se llevó a cabo eliminando el anticuerpo de detección y el lavado 3 veces con 300 μ l de 1X PBS/Tween-20 al 0.1%, seguido de la preparación de una solución de estreptavidina-HRP a razón de 20 ng/ml diluidos en 1X PBS / Tween-20 al 0.1% / BSA al 0.1%, en donde se añadieron 100 μ l de dicha solución a cada pocillo, antes de incubar durante 1 hora a 22°C.

35 La detección consistía en la eliminación de la estreptavidina-HRP y el lavado 3 veces con 300 μ l de 1X PBS / Tween-20 al 0.1%, seguido de la adición de 100 μ l de solución de sustrato quimioluminiscente en cada pocillo. La solución de sustrato se preparó mediante la mezcla de volúmenes iguales de las dos soluciones kit de ELISA SuperSignal Femto, 20 ml + 20 ml, 30 minutos antes de la utilización y se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad. Se leyó la luminiscencia tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad.

40 Para cada condición, se llevó a cabo el ensayo por triplicado y los resultados de los intervalos se presentan en forma de gráfico que muestra el cambio de luminiscencia dependiendo de la concentración de progastrina. Para cada dilución de plasma, se determinó la concentración de progastrina utilizando la ecuación de regresión lineal del intervalo correspondiente (intervalo 1/10 para una muestra diluida 1/10).

45 Métodos y resultados

La mediana de concentración plasmática de progastrina era de 8.45 pM en pacientes con cáncer ovárico (n=8), mientras que la mediana de concentración plasmática de progastrina era de 0 pM en los pacientes de control (n=103) (figura 1). Dichos datos demuestran que los pacientes con cáncer ovárico presentaban concentraciones más altas de progastrina en el plasma que los individuos de control sanos.

Dichos datos demuestran que los pacientes con cáncer ovárico presentan niveles más elevados de progastrina en el plasma que los individuos de control sanos.

55 Ejemplo 2: detección de la concentración de progastrina utilizando anticuerpos monoclonales antiprogastrina

Los pocillos de placas de 96 pocillos Nunc MaxiSORP se recubrieron con un primer anticuerpo específico de progastrina de la manera siguiente. Se diluyeron anticuerpos monoclonales antiprogastrina específicos para la región carboxiterminal hasta una concentración de 3 μ g/ml en una solución de 50 mM, tampón de carbonato/bicarbonato sódico, pH 9.6, en agua MilliQ.

A continuación, se añadió un total de 100 μ l de solución de anticuerpo a cada pocillo de las placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 4°C. Tras la unión, se eliminó la solución de anticuerpo de los pocillos, que a

continucción se lavaron tres veces con 100 µl de tampón de lavado (1X PBS / Tween-20 al 0.1%). A continuación, se añadió un total de 100 µl de tampón de bloqueo (1X PBS / Tween-20 al 0.1% / BSA al 0.1%) a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a 22°C. A continuación se eliminó el tampón de bloqueo y los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado. A continuación, se añadieron las muestras de plasma o suero aisladas de los pacientes a los pocillos en un volumen de 100 µl en una serie de dilución, típicamente diluciones 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10, y después se incubaron durante 2 horas a 22°C. Las muestras de plasma o suero se analizaron por duplicado.

Los ensayos incluían además dos curvas patrón. La primera curva patrón se preparó utilizando diluciones de progastрина recombinante a una cantidad final de 1 ng, 0.5 ng, 0.25 ng, 0.1 ng, 0.05 ng, 0.01 ng y 0 ng por pocillo. La segunda curva patrón, que sirve de control negativo, se preparó a partir de suero humano negativo para progastрина diluido en tampón de bloqueo a las mismas diluciones que las muestras de ensayo, es decir, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10. Alternativamente, al someter a ensayo las muestras de plasma, la segunda curva patrón, que servía de control negativo, se preparó a partir de plasma humano negativo para progastрина diluido en tampón de bloqueo a las mismas diluciones que las muestras de ensayo, es decir, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10.

Tras completar la incubación con las muestras de plasma o suero, se extrajo el contenido de los pocillos y estos se lavaron tres veces con tampón de lavado, 100 µl/pocillo, seguido de la detección de la progastрина unida al primer anticuerpo, mediante la utilización de un segundo anticuerpo específico para la progastрина, de la manera siguiente.

Los anticuerpos monoclonales antiprogastrina acoplados con biotina específicos para la región aminoterminal de la progastрина se diluyeron en tampón de bloqueo hasta una concentración de 0.1 a 10 µg/ml, según el anticuerpo. A continuación, se añadió un total de 100 µl de la solución de anticuerpo a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a 22°C.

Tras completar la unión del anticuerpo secundario, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado, 100 µl/pocillo, seguido de la adición de 100 µl de una solución de estreptavidina-HRP (25 ng/ml en tampón de bloqueo) a cada pocillo y la incubación durante 1 hora a 22°C. Tras completar la incubación con la solución de estreptavidina-HRP, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado, 100 µl/pocillo. Después, se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato quimioluminiscente preparado utilizando un kit de sustrato quimioluminiscente para ELISA de máxima sensibilidad Pierce SuperSignal Femto, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad y después se leyó en un luminómetro.

Basándose en las lecturas del luminómetro, se utilizó el análisis de regresión lineal para derivar la ecuación de las líneas correspondientes a los datos de la curva patrón. Utilizando dicha ecuación, a continuación, se calculó la concentración de progastрина en las diversas muestras de los pacientes.

La mediana de concentración plasmática de progastрина se calculó en los pacientes con cáncer ovárico y se comparó con la mediana de concentración plasmática de progastрина en el plasma de los pacientes de control. Dichos datos demuestran que los pacientes con cáncer ovárico presentaban niveles elevados de progastрина en el plasma en comparación con los individuos de control sanos.

Ejemplo 3, no forma parte de la invención reivindicada, pero resulta útil para su comprensión:

Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-hPG sobre las líneas celulares de cáncer

3.1. Actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG

PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 son líneas celulares utilizadas comúnmente para estudiar el cáncer ovárico, que producen y secretan progastрина. Los anticuerpos monoclonales de PG se sometieron a ensayo para su capacidad de inhibir la proliferación en dichas líneas celulares diferentes. La supervivencia de las células de cada una de las líneas celulares Caov-3, ES-2, SK-OV-3, KATO-III, AGS y MGC-803 se sometió a ensayo utilizando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

Para cada experimento, se sembraron 50,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contenía suero de feto bovino y se incubaron durante 8 horas. Las células se sometieron a ayuno de suero durante la noche y desde las 24 horas posteriores al tiempo de siembra (tiempo "T0"), las células fueron tratadas por sextuplicado cada 12 h durante 48 horas, en ausencia de suero de feto bovino, con 1 a 20 µg/ml de anticuerpos monoclonales de control (anticuerpo monoclonal antipiuromicina) (mAb CT) o con 1 a 20 µg/ml de mAb anti-hPG, en el que dicho mAb es un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal o un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal.

Dicho mAb es un anticuerpo anti-hPG C-terminal, seleccionado de entre:

- un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 28, nº 29 y nº 30, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-

L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 31, nº 32 y nº 33,

- un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 34, nº 35 y nº 36, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 37, nº 38 y nº 39,

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

- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, nº 5 y nº 6, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, nº 8 y nº 9,

- un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 10, nº 11 y nº 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, nº 14 y nº 15, respectivamente,

- un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 16, nº 17 y nº 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 19, nº 20 y nº 21, respectivamente,

- un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 22, nº 23 y nº 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEC ID nº 25, nº 26 y nº 27, respectivamente.

El número de células en T0 se contó en un pocillo de control, para cada experimento.

Específicamente, el número de células vivas tanto en pocillos de control como en pocillos tratados con mAb anti-hPG se contó a las 48 horas; después, se calculó la diferencia entre cada recuento celular y el recuento celular determinado en T0. El número resultante de células tratadas con mAb anti-hPG a continuación se expresó como porcentaje del número de células tratadas con mAb de control.

El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo el número de células en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control. Se determinó la significancia estadística utilizando un ANOVA de un factor con una prueba posthoc de Tukey. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$. En cada línea celular, los anticuerpos anti-hPG redujeron la supervivencia celular.

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

Se sometieron a ensayo anticuerpos humanizados contra PG para su capacidad de inhibir la proliferación de las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3. La supervivencia de las células de las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 se sometió a ensayo utilizando diferentes anticuerpos anti-hPG humanizados.

Para cada experimento, se sembraron 80,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contenía suero de feto bovino y se incubaron durante 8 horas. Las células se sometieron a ayuno de suero durante la noche y desde las 24 horas posteriores al tiempo de siembra (tiempo "T0"), las células fueron tratadas por sextuplicado cada 12 h durante 48 horas, en ausencia de suero de feto bovino, con 20 µg/ml de anticuerpos de control humanizados (anticuerpo anti-FcG1 humano, de BioXCell) (CT Hz) o con 20 µg/ml de anti-hPG Hz, en el que dicho Hz es un anticuerpo anti-hPG humanizado C-terminal o un anticuerpo anti-hPG humanizado N-terminal. El número de células en T0 se contó en un pocillo de control, para cada experimento.

Específicamente, el número de células vivas tanto en pocillos de control como en pocillos tratados con anti-hPG Hz se contó a las 48 horas; después, se calculó la diferencia entre cada recuento celular y el recuento celular determinado en T0.

El tratamiento con anticuerpos anti-hPG Hz redujo el número de células en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control.

3.3. Actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre la frecuencia de células madre de cáncer

Se sometieron a ensayo anticuerpos monoclonales contra PG para su capacidad de reducir la frecuencia de las

células madre de cáncer (CMC) en líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 utilizando el ensayo de dilución limitativa extrema (ELDA). La frecuencia de las CMC de cada una de las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 se sometió a ensayo utilizando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

5 Para cada experimento, las células se sembraron con adherencia ultrabaja (ULA) (placas de 96 pocillos) a concentraciones celulares fijas en cada pocillo utilizando un citómetro de flujo FACS Aria y se utilizó un abanico de concentraciones de una a 500 células en cada pocillo. Las células se cultivaron durante hasta 11 días en placas ULA con medio M11 (Macari et al., Oncogene, 2015) y se trataron cada 3 o 4 días con 1 a 20 µg/ml de anticuerpos monoclonales de control (anticuerpo monoclonal antipiruomicina) (mAb CT) o con 1 a 20 µg/ml de mAb anti-hPG, en el que dicho mAb es un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal o un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal.

15 Específicamente, al final de la etapa de incubación, se observaron las placas con un microscopio con contraste de fase y se evaluó el número de pocillos positivos en cada concentración celular. Finalmente, se utilizó la herramienta web ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) para calcular las frecuencias de CMC de cada grupo de tratamiento y ensayo para cualquier diferencia estadística entre grupos (prueba de Chi cuadrado modificada).

20 El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo la frecuencia de CMC en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control.

3.4. Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-hPG humanizados sobre la frecuencia de células madre de cáncer

• Ensayo de formación de esferas

25 Se sometieron a ensayo anticuerpos contra PG humanizados para su capacidad de reducir la frecuencia de las células madre de cáncer (CMC) en las líneas celulares Caov-3, ES-2 y SK-OV-3 utilizando el ensayo de formación de esferas.

30 Para cada experimento, se sembraron 500 células en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (ULA). Las células se cultivaron durante hasta 10 días en placas ULA con medio M11 (Macari et al., Oncogene, 2015) y se trataron cada 3 o 4 días con 20 µg/ml de anticuerpos de control humanizados (anticuerpo anti-FcG1 humano de BioXCell) (CT Hz) o con 20 µg/ml de anti-hPG Hz (PG Hz), en el que dicho Hz es un anticuerpo anti-hPG humanizado C-terminal o un anticuerpo anti-hPG humanizado N-terminal.

35 Específicamente, al final de la etapa de incubación, se fotografiaron los pocillos mediante microscopía de campo brillante; se analizaron las imágenes y se contaron las esferas con un diámetro medio superior a 30 µm.

40 El tratamiento con anticuerpos anti-hPG humanizados redujo la frecuencia de CMC en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control.

• Ensayo de dilución limitativa extrema

45 Se sometieron a ensayo anticuerpos humanizados contra PG para su capacidad de reducir la frecuencia de las células madre de cáncer (CMC) en las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626 y SK-OV-3 utilizando el ensayo de dilución limitativa extrema (ELDA). La frecuencia de CMC de cada una de las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626 y SK-OV-3 se sometió a ensayo utilizando diferentes anticuerpos anti-hPG humanizados.

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

60 Específicamente, al final de la etapa de incubación, se observaron las placas con un microscopio con contraste de fase y se evaluó el número de pocillos positivos en cada concentración celular. Finalmente, se utilizó la herramienta web ELDA (<http://www.bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>) para calcular las frecuencias de CMC de cada grupo de tratamiento y ensayo para cualquier diferencia estadística entre grupos (prueba de Chi cuadrado modificada).

El tratamiento con anticuerpos anti-hPG humanizados redujo la frecuencia de CMC en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control.

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

5 PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 son líneas celulares utilizadas comúnmente para estudiar el cáncer ovárico, que producen y secretan progesterona. Se sometieron a ensayo anticuerpos monoclonales contra PG para su capacidad de inhibir la ruta de WNT/ β -catenina en dichas diferentes líneas celulares utilizando la expresión de la proteína survivina, un gen diana de la ruta WNT/ β -catenina bien conocido, como lectura. La expresión de survivina de cada una de las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 se sometió a ensayo utilizando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

10 Para cada experimento, se sembraron 50,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contenía suero de feto bovino y se incubaron durante 8 horas. Las células se sometieron a ayuno de suero durante la noche y desde las 24 horas posteriores al tiempo de siembra se trataron por cuadruplicado cada 12 h durante 72 horas, en ausencia de suero de feto bovino, con 1 a 20 μ g/ml de anticuerpos monoclonales de control (anticuerpo monoclonal antipirubicina) (mAb CT) o con 1 a 20 μ g/ml de mAb anti-hPG, en el que dicho mAb es un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal o un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal.

15 Específicamente, tras 72 horas de tratamiento, se recolectaron las células y se extrajeron las proteínas totales utilizando tampón RIPA. A continuación, se sometió a transferencia western una cantidad igual de proteína procedente de células tratadas con mAb CT o con mAb anti-hPG, utilizando anticuerpo antisurvivina (anticuerpo monoclonal, n° 2802 de Cell Signaling) y anticuerpo antiactina como control de carga (anticuerpo monoclonal, n° A4700 de Sigma). La cuantificación se llevó a cabo utilizando el sistema GBOX chemi de Syngene.

20 El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo la expresión de survivina en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control. Se determinó la significancia estadística utilizando una prueba T de Student no apareada. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

25 3.6. Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-hPG humanizados sobre la ruta de WNT/ β -catenina

30 Se sometieron a ensayo anticuerpos contra PG humanizados para su capacidad de inhibir la ruta de WNT/ β -catenina en las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 utilizando la expresión de la proteína survivina, un gen diana de la ruta WNT/ β -catenina bien conocido, como lectura. La expresión de survivina de cada una de las líneas celulares PA-1, Caov-3, SW626, ES-2 y SK-OV-3 se sometió a ensayo utilizando diferentes anticuerpos anti-hPG humanizados.

35 Para cada experimento, se sembraron 50,000 células en placas de 6 pocillos en medio que contenía suero de feto bovino y se incubaron durante 8 horas. Las células se sometieron a ayuno de suero durante la noche y desde las 24 horas posteriores al tiempo de siembra se trataron por cuadruplicado cada 12 h durante 72 horas, en ausencia de suero de feto bovino, con 1 a 20 μ g/ml de anticuerpos de control humanizados (anticuerpo anti-FcG1 humano, de BioXCell) (CT Hz) o con 1 a 20 μ g/ml de anti-hPG Hz, en el que dicho Hz es un anticuerpo anti-hPG humanizado C-terminal o un anticuerpo anti-hPG humanizado N-terminal.

40 Específicamente, tras 72 horas de tratamiento, se recolectaron las células y se extrajeron las proteínas totales utilizando tampón RIPA. A continuación, se sometió a transferencia western una cantidad igual de proteína procedente de células tratadas con mAb CT o con mAb anti-hPG, utilizando anticuerpo antisurvivina (anticuerpo monoclonal, n° 2802 de Cell Signaling) y anticuerpo antiactina como control de carga (anticuerpo monoclonal, n° A4700 de Sigma). La cuantificación se llevó a cabo utilizando el sistema GBOX chemi de Syngene.

45 El tratamiento con anticuerpos anti-hPG humanizados redujo la expresión de survivina en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control. Se determinó la significancia estadística utilizando una prueba T de Student no apareada. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico *in vitro* del cáncer ovárico en un sujeto, que comprende las etapas de:
- 5 a) poner en contacto dicha muestra biológica de dicho sujeto con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
- b) detectar la unión de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina en dicha muestra, en el que
10 dicha unión indica la presencia del cáncer ovárico en dicho sujeto,
- en el que dicha muestra biológica es seleccionada de entre: sangre, suero y plasma.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa b) comprende además determinar la concentración de progastrina y en el que una concentración de progastrina de por lo menos 5 pM, por lo menos 10 pM, por lo menos
15 20 pM, por lo menos 30 pM o por lo menos 40 pM en dicha muestra biológica es indicativa de la presencia de cáncer ovárico en dicho sujeto.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho cáncer ovárico está metastatizado.
- 20 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, que comprende las etapas adicionales de:
- c) determinar una concentración de referencia de progastrina en una muestra de referencia, preferentemente una muestra biológica aislada de un sujeto sano,
- 25 d) comparar la concentración de progastrina en dicha muestra biológica con dicha concentración de referencia de progastrina,
- e) determinar, a partir de la comparación de la etapa d), la presencia del cáncer ovárico.
- 30 5. Método según la reivindicación 4, en el que está presente un cáncer ovárico si la concentración de progastrina en la etapa b) es superior a la concentración de referencia de progastrina en la etapa c).
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una segunda prueba de diagnóstico de cáncer ovárico.
- 35 7. Método de monitorización de la eficacia de un tratamiento para el cáncer ovárico en un paciente, que comprende las etapas de:
- a) determinar la concentración de progastrina en una primera muestra biológica obtenida de dicho paciente antes del tratamiento, que comprende:
40 poner en contacto dicha primera muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
medir la unión de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina en dicha primera muestra; y
- 45 b) determinar la concentración de progastrina en una segunda muestra biológica obtenida de dicho paciente tras el tratamiento, que comprende:
poner en contacto dicha segunda muestra biológica con por lo menos una molécula de unión a progastrina,
50 medir la unión de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina en dicha segunda muestra; y
- c) comparar la concentración de progastrina de la etapa a) con la concentración de progastrina de la etapa b),
55 en el que una concentración de progastrina en la primera muestra superior a la concentración de progastrina en la segunda muestra indica que el tratamiento es eficaz; y
en el que dicha muestra biológica es seleccionada de entre: sangre, suero y plasma.
- 60 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha molécula de unión a progastrina es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las 6 CDR del anticuerpo a partir del cual deriva.
- 65 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es seleccionado en el grupo que consiste en:

ES 3 015 244 T3

- unos anticuerpos monoclonales que se unen a la región N-terminal de la progastrina, en el que la región N-terminal es representada preferentemente por SEC ID nº 2, y
 - unos anticuerpos monoclonales que se unen a la región C-terminal de la progastrina, en el que la región C-terminal es representada preferentemente por SEC ID nº 3,
- en el que dicho fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las 6 CDR del anticuerpo a partir del cual deriva.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho anticuerpo que se une a la progastrina es un anticuerpo monoclonal seleccionado en el grupo que consiste en:
- un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 7, 8 y 9, respectivamente,
 - un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 13, 14 y 15, respectivamente,
 - un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 19, 20 y 21, respectivamente,
 - un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 25, 26 y 27, respectivamente,
 - un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 28, 29 y 30, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 31, 32 y 33, respectivamente, y
 - un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 34, 35 y 36, respectivamente, y una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente por lo menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 37, 38 y 39, respectivamente.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la unión de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina se detecta y/o mide mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), transferencia western o inmunohistoquímica (IHC), preferentemente mediante ELISA o RIA, más preferentemente mediante ELISA.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha muestra biológica se pone en contacto con una primera molécula, que se une a una primera parte de la progastrina, y con una segunda molécula, que se une a una segunda parte de la progastrina.

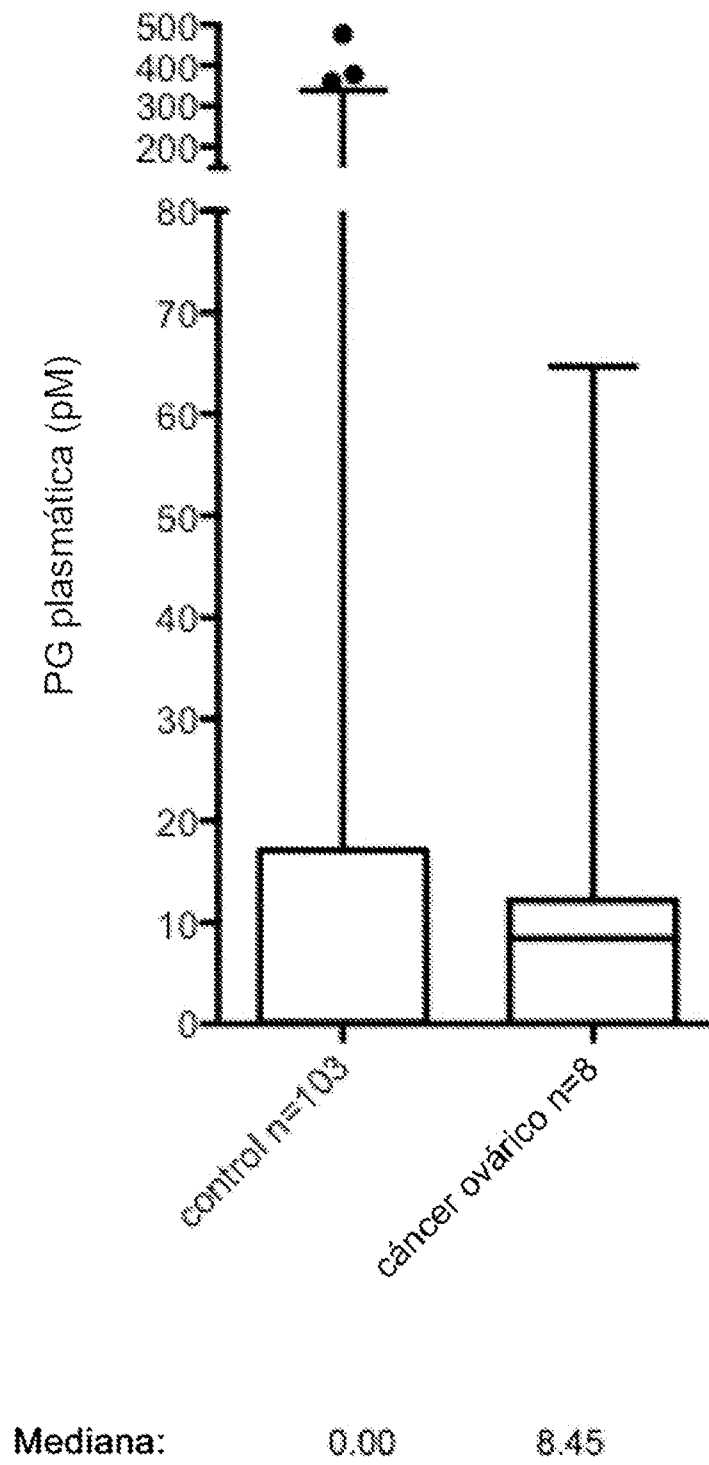


FIGURA 1

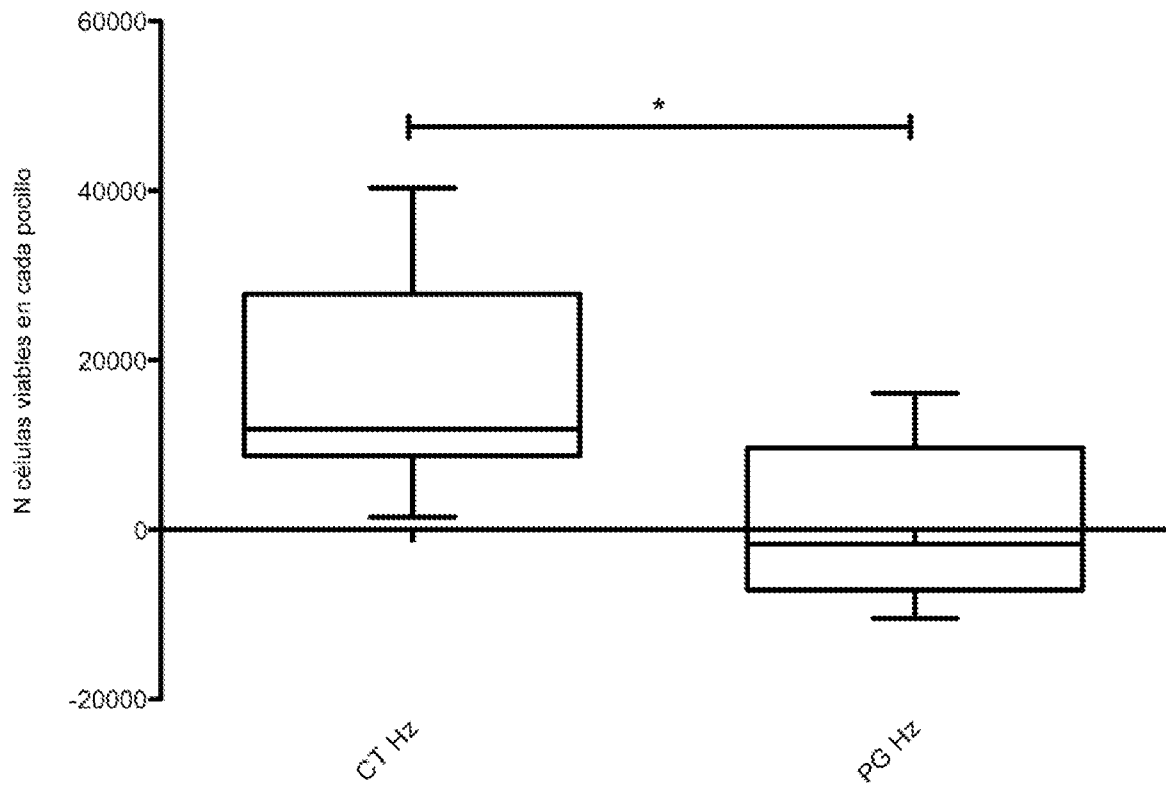


FIGURA 2

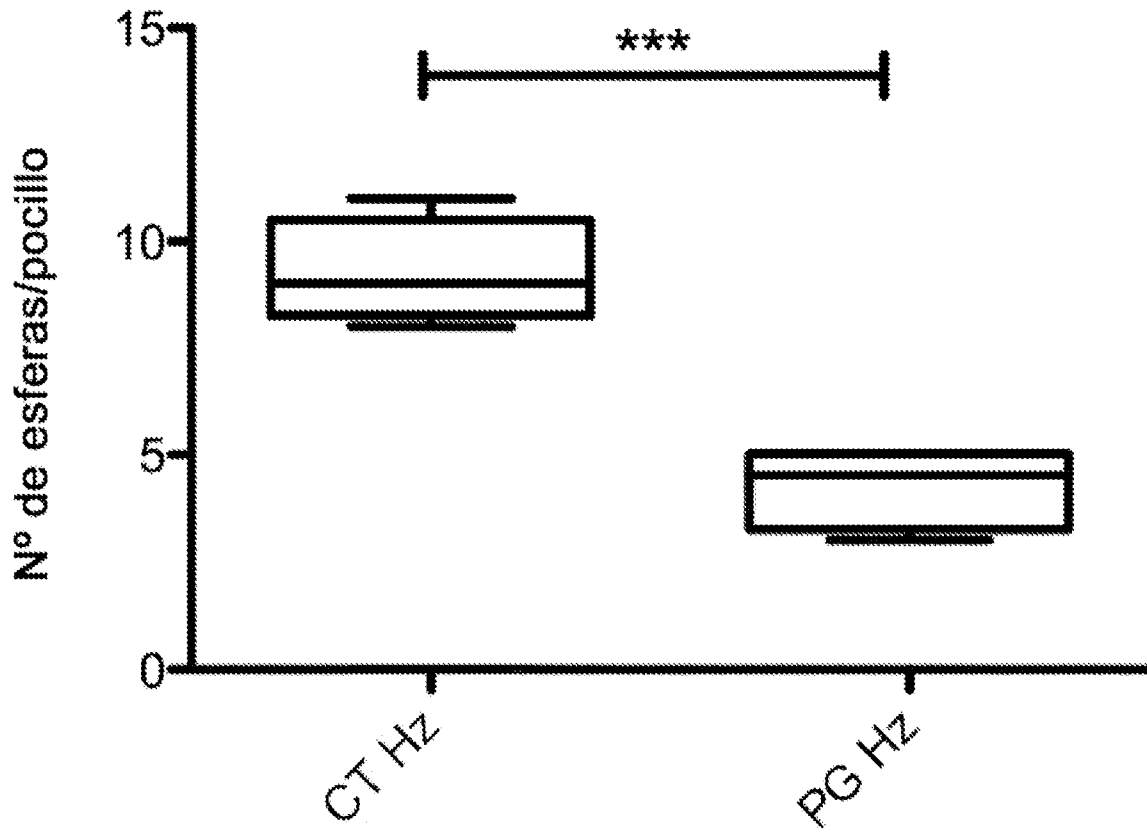


FIGURA 3