

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 412**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.01.2017** **PCT/EP2017/050034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017** **WO17114973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2017** **E 17700481 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2024** **EP 3397965**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para evaluar el riesgo de ocurrencia de cáncer**

30 Prioridad:

31.12.2015 EP 15307190

05.02.2016 EP 16305133

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2024

73 Titular/es:

ECS-PROGASTRIN SA (100.0%)

Avenue du Grey 38 A

Lausanne 1004, CH

72 Inventor/es:

FLOCH, JEAN-FRANÇOIS

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 987 412 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 procedimientos para evaluar el riesgo de ocurrencia de cáncer

Introducción

5 El cáncer es una enfermedad multifacética en la que un grupo de células muestra un crecimiento descontrolado, invasión que invade y destruye los tejidos adyacentes y, a veces, metástasis o se disemina a otros lugares del cuerpo a través de la linfa o la sangre. Estas tres propiedades malignas de los cánceres las diferencian de los tumores benignos, que no invaden ni producen metástasis.

10 Actualmente, se utilizan varios procedimientos para tratar cada tipo de cáncer, incluida la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia dirigida. La terapia exitosa contra el cáncer se dirige al tumor primario y a cualquier metástasis, ya sea clínicamente aparente o microscópica.

15 La selección de un tratamiento apropiado es crucial para el paciente. Es esencial saber cuándo utilizar de inmediato un protocolo de tratamiento fuerte y agresivo para evitar la extensión de un cáncer agresivo. Por el contrario, realizar un tratamiento intenso y agresivo cuando no es necesario para el tumor transportado por el paciente también es una desventaja para el paciente. De hecho, los tratamientos intensos y agresivos siempre conducen a toxicidades adversas que pueden afectar significativamente la calidad de vida del paciente. Por ejemplo, la mayoría de ellos son mutagénicos y, por lo tanto, son propensos a inducir tumores secundarios. Además, tales tratamientos intensos y agresivos suelen ser muy costosos y, por lo tanto, deben realizarse sólo cuando es necesario.

20 Actualmente, la selección de tratamiento para tumores sólidos se basa en la clasificación tumoral, que generalmente se realiza mediante la prueba de tumor/nodo/metástasis (TNM) del American Joint Committee on Cancer (AJCC, por sus siglas en inglés). El sistema TNM asigna un número basado en tres categorías. "T" indica el tamaño del tumor, "N" el grado de afectación del ganglio linfático y "M" el grado de metástasis. La etapa más amplia de un cáncer generalmente se cita como un número I, II, III, IV derivado del valor TNM agrupado por pronóstico; un número más alto indica un cáncer más avanzado y probablemente un resultado peor.

25 Se reconoce comúnmente que, si bien este sistema de prueba y clasificación proporciona información valiosa sobre la etapa en la que se ha diagnosticado el cáncer sólido en el paciente, es impreciso e insuficiente. En particular, está limitado a tumores sólidos. Por otro lado, los tumores líquidos se caracterizan principalmente por la identificación de alteraciones citogenéticas.

30 Lo más importante es que la prueba TNM no identifica las primeras etapas de la progresión tumoral. Estas primeras etapas ofrecen la ventana más prometedora para la terapia. La detección de un cáncer al comienzo de su desarrollo permite una terapia dirigida y eficiente, con efectos secundarios reducidos. Por lo tanto, es importante identificar a los pacientes en la etapa más temprana posible como parte de una selección de toda la población. Por lo tanto, se puede identificar el cáncer en una comunidad tempranamente, lo que permite una intervención y manejo más tempranos para reducir la mortalidad y el sufrimiento de dicha enfermedad. Existe una necesidad real de mejores pruebas de pronóstico de la aparición del cáncer, no solo para mejorar la supervivencia global del paciente, sino también para mejorar su calidad de vida y mantener las quimioterapias agresivas y costosas para los pacientes que realmente se beneficiarán de ellas. En particular, existe la necesidad de una prueba que evalúe el riesgo de que un sujeto desarrolle un cáncer.

Descripción

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realización que se exponga en el presente documento se ofrece únicamente a título informativo.

40 La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar el riesgo de aparición de un cáncer en un sujeto humano al que no se le ha diagnosticado previamente cáncer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) determinar el nivel de progastrina en una muestra de dicho sujeto, por ejemplo una muestra elegida entre sangre, suero y plasma;

b) determinar el riesgo de que dicho sujeto desarrolle un cáncer en función del nivel de la etapa a)

45 en donde la determinación de la etapa a) incluye:

- poner en contacto dicha muestra con al menos el anticuerpo monoclonal Mab14 producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 París CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158,

- y medir la unión de dicho anticuerpo monoclonal a la progastrina.

Preferentemente, la determinación de la etapa a) incluye poner en contacto dicha muestra con al menos otra molécula de unión a progastrina, uniéndose dicha molécula de unión a progastrina a un epítipo dentro del extremo terminal N de la progastrina. En una realización, la otra molécula de unión a progastrina es preferentemente un anticuerpo anti-progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, más preferentemente un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

En una realización preferente, el anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en:

- Un anticuerpo monoclonal mAb3 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente,
- Un anticuerpo monoclonal mAb4 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente,
- Un anticuerpo monoclonal mAb16 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente, y
- Un anticuerpo monoclonal mAb19 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal Mab14 está unido a un vehículo insoluble o parcialmente soluble y el segundo anticuerpo está marcado con una fracción detectable.

Preferentemente, el nivel de progastrina se determina en la etapa a) con un ensayo ELISA.

En una realización preferente, el riesgo de desarrollar cáncer en el sujeto se determina comparando la concentración de la etapa a) con un nivel de referencia, siendo dicho nivel de referencia preferentemente 0 pM.

En otro aspecto, la invención también se refiere a un kit que comprende al menos el anticuerpo monoclonal Mab14 producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 París CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158, para su uso en el procedimiento de la invención. Este kit puede comprender:

- un primer anticuerpo anti-progastrina, en el que dicho primer anticuerpo anti-progastrina es el anticuerpo monoclonal Mab14 producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 París CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158; y
- un segundo anticuerpo anti-progastrina, estando marcado dicho segundo anticuerpo anti-progastrina, en el que dicho segundo anticuerpo anti-progastrina es:
 - un anticuerpo policlonal que se une al extremo terminal N de la progastrina o
 - un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en:
 - Un anticuerpo monoclonal mAb3 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente,
 - Un anticuerpo monoclonal mAb4 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente,
 - Un anticuerpo monoclonal mAb16 que comprende una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR,

CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente, y

- 5 - Un anticuerpo monoclonal mAb19 que comprende una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente.

10 También se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un sistema de procesamiento que incluye una unidad de cálculo y una interfaz de entrada, estando dicha unidad de cálculo adaptada para implementar el procedimiento descrito anteriormente.

La presente divulgación describe además un procedimiento simple y eficiente para pronosticar la aparición de un cáncer en sujetos que nunca han sido diagnosticados previamente con cáncer. Los presentes inventores han demostrado que la presencia de progastrina en una muestra de un sujeto es una indicación buena y confiable de si dicho sujeto desarrollará cáncer.

15 Esta relación es independiente de la edad o cualquier otro parámetro. La progastrina ofrece así una herramienta simple y eficiente para determinar los riesgos de un sujeto de desarrollar un cáncer. La progastrina es así un marcador de las etapas más tempranas del cáncer.

20 Las pruebas de pronóstico basadas en los niveles de progastrina se han descrito anteriormente. Sin embargo, dichas pruebas se limitan a predecir el riesgo de que un paciente que presenta un pólipo hiperplásico desarrolle una neoplasia colónica tras la resección de dichos pólipos hiperplásicos (WO 2012/164035; Do et al., Cancer Prev Res, 5(4): 675-684, 2012). Por tanto, dichas pruebas tienen una utilidad limitada, ya que se limitan a pronosticar un cáncer que ya se sabe que está presente. No pueden utilizarse para evaluar el riesgo de que un sujeto que no presenta ningún signo de cáncer desarrolle esta enfermedad.

25 En un primer aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de evaluación del riesgo de aparición de un cáncer en un sujeto que no ha sido diagnosticado previamente con cáncer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) determinar el nivel de progastrina en la muestra de dicho sujeto;
- b) determinar el riesgo de que dicho sujeto desarrolle un cáncer en función del nivel de la etapa a).

30 Un análisis de ROC (característica operativa del receptor) de los datos clínicos ha demostrado que la presencia de progastrina es un marcador muy específico y sensible. Progastrina es esencialmente no detectable en muestras de sujetos que no desarrollan cáncer. Por otro lado, un sujeto que nunca ha sido diagnosticado con cáncer tiene un riesgo significativo de desarrollar cáncer en el futuro si la progastrina es detectable en su muestra.

35 El procedimiento de la invención permite evaluar de manera fácil y confiable el riesgo de que un sujeto que no ha sido diagnosticado previamente con cáncer desarrolle cáncer. En otras palabras, este procedimiento también permite la identificación de sujetos que desarrollarán cáncer, aunque actualmente no muestren ningún síntoma. Dichos pacientes ya tienen cáncer, aunque no perciban ningún síntoma.

40 La expresión "evaluación de un riesgo de desarrollo de un cáncer en un sujeto" designa la determinación de una probabilidad relativa para que un sujeto determinado muestre síntomas de cáncer en el futuro. Un procedimiento de acuerdo con la invención representa una herramienta en la evaluación de dicho riesgo, en combinación con otros procedimientos o indicadores tales como examen clínico, biopsia y determinación del nivel de un biomarcador de cáncer conocido, tal como, por ejemplo, CA125 y/u OVA1.

45 Un "sujeto" que puede someterse a la metodología descrita en este documento puede ser cualquiera de los animales mamíferos, incluidos humanos, perros, gatos, vacas, cabras, cerdos, puercos, ovejas y monos. Un sujeto humano puede ser conocido como un "paciente". Preferentemente, un "sujeto" es un mamífero que no padece cáncer y no se sospecha que padezca cáncer y no ha sido diagnosticado con cáncer. Tal como se usa en el presente documento, un "sujeto que padece cáncer" se refiere a un mamífero que padece cáncer y muestra síntomas del mismo, o se le ha diagnosticado cáncer. Un sujeto ha sido "diagnosticado con cáncer" cuando un examen médico realizado por un médico ha revelado la presencia de cáncer. Tal como se usa en el presente documento, un "síntoma" es cualquier evidencia subjetiva de enfermedad, por ejemplo, cáncer. Un "síntoma" es una desviación de la función o sensación normal que se nota por un paciente, que refleja la presencia de un estado inusual, o de una enfermedad, por ejemplo, cáncer. Una enfermedad se considera asintomática si un paciente es portador de dicha enfermedad, pero no experimenta ningún síntoma. Las condiciones asintomáticas pueden no descubrirse hasta que el paciente se someta a pruebas médicas, tales como, por

ejemplo, medir el nivel de progastrina.

El presente procedimiento también es particularmente útil porque permite identificar un cáncer en un sujeto, incluso cuando el sujeto nunca ha sido diagnosticado con cáncer y/o no experimenta ningún síntoma del mismo. La progastrina es un marcador de cáncer altamente específico y sensible. La detección de progastrina en un sujeto indica que hay una alta probabilidad de que dicho sujeto desarrolle un cáncer. La progastrina es, por lo tanto, un biomarcador particularmente importante para identificar sujetos que desarrollarán cáncer, a pesar de que todavía no muestran ningún síntoma. El presente procedimiento es particularmente ventajoso porque permite seleccionar una población de sujetos aparentemente sanos, es decir, que nunca han sido diagnosticados con cáncer y/o no han experimentado ningún síntoma de los mismos, e identificar a aquellos que desarrollarán cáncer. Por "detección" se hace referencia en este documento a un procedimiento usado para identificar dentro de una población la posible presencia de una enfermedad aún no diagnosticada en individuos sin signos o síntomas. Esto puede incluir individuos con enfermedad sintomática pre-sintomática o no reconocida. Será claro para la persona experta que, como tal, las pruebas de detección son algo únicas ya que se realizan en personas aparentemente en buen estado de salud. El objetivo inmediato de la detección del cáncer es la identificación de cáncer en etapa temprana o lesiones precancerosas antes de que una persona desarrolle síntomas y en un punto en la trayectoria de la enfermedad cuando es probable que el tratamiento produzca curación.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para pronosticar un cáncer en un sujeto que no ha sido diagnosticado previamente con cáncer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) determinar el nivel de progastrina en la muestra de dicho sujeto;

b) pronosticar un cáncer basado en el nivel de la etapa a).

"Pronóstico" como se usa en el presente documento significa la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la predicción del probable desarrollo o resultado de una enfermedad. Por ejemplo, si una muestra de un sujeto es negativa para la presencia de progastrina, entonces el "pronóstico" para ese sujeto es mejor que si la muestra es positiva para progastrina.

Por "progastrina", se hace referencia en este documento al péptido de progastrina de mamífero. La progastrina está formada por la escisión de los primeros 21 aminoácidos (el péptido señal) a partir de la preprogastrina, un péptido de 101 aminoácidos (referencia de la secuencia de aminoácidos: AAB19304.1) que es el producto primario de traducción del gen de gastrina. La cadena de 80 aminoácidos de la progastrina se procesa adicionalmente por escisión y enzimas modificadoras a varias formas de hormonas de la gastrina biológicamente activas: gastrina 34 (G34) y gastrina extendida por glicina 34 (G34-Gly), que comprende aminoácidos 38-71 de progastrina, gastrina 17 (G17) y gastrina 17 extendida por glicina (G17-Gly), que comprende los aminoácidos 55 a 71 de progastrina.

Preferentemente, el péptido de progastrina es progastrina humana. Más preferentemente, la expresión "progastrina humana" se refiere a la PG humana de la secuencia SEQ ID NO: 1. La progastrina humana comprende notablemente un dominio N-terminal y un dominio C-terminal que no están presentes en las formas de la hormona gastrina biológicamente activa mencionadas anteriormente. Preferentemente, la secuencia de dicho dominio N-terminal está representada por SEQ ID NO: 2. Preferentemente, la secuencia de dicho dominio C-terminal está representada por SEQ ID NO: 3.

La presente divulgación proporciona procedimientos para la detección de progastrina en muestras, especialmente de muestras biológicas tales como fluidos biológicos y células, tejidos, muestras de biopsias y secciones de órganos, etc.

Por "muestra biológica" se hace referencia en este documento a cualquier muestra que pueda tomarse de un sujeto. Tal muestra debe permitir la determinación de los niveles de expresión de progastrina. Progastrina es conocida por ser una proteína secretada. Las muestras biológicas preferentes para la determinación del nivel de la proteína progastrina incluyen, por lo tanto, fluidos biológicos. Un "fluido biológico" como se usa en el presente documento significa cualquier fluido que incluye material de origen biológico. Los fluidos biológicos preferentes para uso en el presente procedimiento incluyen fluidos corporales de un animal, por ejemplo un mamífero, preferentemente un sujeto humano. El fluido corporal puede ser cualquier fluido corporal, incluidos, entre otros, sangre, plasma, suero, linfa, líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, sudor y orina. Preferentemente, dichas muestras biológicas líquidas preferentes incluyen muestras tales como una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de linfa. Más preferentemente, la muestra biológica es una muestra de sangre. De hecho, tal muestra de sangre puede obtenerse mediante una recolección de sangre completamente inofensiva del paciente y, por lo tanto, permite una evaluación no invasiva de los riesgos de que el sujeto desarrolle un tumor.

Una "muestra biológica" como se usa en este documento también incluye una muestra de cáncer sólido del paciente a analizar, cuando el cáncer es un cáncer sólido. Dicha muestra de cáncer sólido permite a la persona experta realizar cualquier tipo de medición del nivel del biomarcador. En algunos casos, los procedimientos de acuerdo con la invención pueden comprender además una etapa preliminar de tomar una muestra de cáncer sólido del paciente. Mediante una

"muestra de cáncer sólido", se deriva 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" debería limitarse al tejido tumoral tomado del paciente. Dicha "muestra de cáncer" puede ser una muestra de biopsia o una muestra tomada de una terapia de resección quirúrgica.

- 5 Según un aspecto, la muestra del paciente es una célula cancerosa o un tejido canceroso.

Esta muestra puede tomarse y, si es necesario, prepararse según los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. En particular, es bien conocido en la técnica que la muestra debe tomarse de un sujeto en ayunas.

La célula cancerosa o tejido canceroso no está particularmente limitado.

- 10 Como se usa en este documento, el término "cáncer" se refiere o describe la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por la proliferación celular no regulada. Los términos "cáncer" y "canceroso" tal como se usan en el presente documento pretenden abarcar todas las etapas de la enfermedad. Un "cáncer" como se usa en el presente documento es cualquier neoplasia maligna que resulta del crecimiento indeseado, la invasión, y bajo ciertas condiciones, metástasis de células dañadas en un organismo. Las células que dan lugar al cáncer están alteradas genéticamente y generalmente han perdido su capacidad de controlar la división celular, el comportamiento de migración celular, el estado de diferenciación y/o la maquinaria de muerte celular. La mayoría de los cánceres forman un tumor, pero algunos cánceres hematopoyéticos, como la leucemia, no.
- 15

- Por lo tanto, un "cáncer" como se usa en el presente documento puede incluir cánceres tanto benignos como malignos. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más específicamente, un cáncer se selecciona del grupo que comprende cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer epitelial de células escamosas), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamosa de pulmón, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer laríngeo, cáncer del peritoneo, cáncer del esófago, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer de estroma gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cerebro, cáncer del sistema nervioso, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de vías urinarias, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer renal o renal, cáncer de próstata, cáncer de vesícula biliar, cáncer vulvar, cáncer testicular, cáncer de tiroides, sarcoma de Kaposi, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma en el pene, cáncer de piel no melanoma, melanoma, melanoma cutáneo, melanoma de extensión superficial, melanoma de lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, mieloma múltiple y linfoma de células B (incluido el linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin, tal como, por ejemplo, linfoma no Hodgkin de grado bajo/folicular (NHL); NHL linfocítica pequeña (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado; enfermedad voluminosa NHL; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y Macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica (CML); Leucemia mieloblástica aguda (AML); y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD), así como proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (como el asociado con tumores cerebrales), síndrome de Meigs, cáncer de cerebro, así como de cabeza y cuello, incluyendo cáncer de labio y de cavidad oral y metástasis asociadas.
- 20
- 25
- 30
- 35

- Preferentemente, dicho cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de labio y de cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer laríngeo, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer de estroma gastrointestinal, cáncer de páncreas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, hepatoma, carcinoma hepático, carcinoma anal, cáncer de tiroides, cáncer de piel no de melanoma, melanoma de piel, cáncer de cerebro, cáncer de sistema nervioso, cáncer de testículo, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer de ovario o cáncer de mama.
- 40
- 45

- Más preferentemente, dicho cáncer es cáncer de esófago, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer de estroma gastrointestinal, cáncer de páncreas, linfoma de Hodgkin, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, hepatoma, carcinoma hepático, carcinoma anal, cáncer de piel no melanoma, melanoma cutáneo, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer endometrial, cáncer de ovario o cáncer de mama.
- 50

Preferentemente, el riesgo de que dicho sujeto desarrolle un cáncer se determina en la etapa b) comparando el nivel de la etapa a) con un nivel de referencia.

El término "nivel de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere al nivel de expresión del marcador de

cáncer considerado, es decir, progastrina, en una muestra de referencia. Una "muestra de referencia", como se usa en el presente documento, significa una muestra obtenida de sujetos, preferentemente dos o más sujetos, que se sabe que están libres de la enfermedad o, alternativamente, de la población general. Los niveles de expresión de referencia adecuados del marcador de cáncer se pueden determinar midiendo los niveles de expresión de dicho marcador de cáncer en varios sujetos adecuados, y dichos niveles de referencia se pueden ajustar a poblaciones específicas de sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor mediano, un valor medio o un valor comparado con un valor de referencia o de control particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual como, por ejemplo, un valor obtenido a partir de una muestra del sujeto que se está analizando, pero en un momento anterior en el tiempo. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, como de una población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o en un conjunto de muestras que incluyan o excluyan la muestra que se va a analizar.

Ventajosamente, un "nivel de referencia" es un nivel de progastrina predeterminado, obtenido a partir de una muestra biológica de un sujeto con un estado particular conocido en lo que respecta al cáncer. En particular, el nivel de referencia utilizado para la comparación con la muestra de prueba en la etapa (b) puede haberse obtenido a partir de una muestra biológica de un sujeto sano, o de una muestra biológica de un sujeto que padece cáncer; se entiende que el perfil de expresión de referencia también puede obtenerse a partir de un conjunto de muestras biológicas de sujetos sanos o de un conjunto de muestras de sujetos que padecen cáncer. Los presentes inventores han demostrado que el nivel de progastrina en sujetos sanos en ayunas es de 0 pM. Preferentemente, el nivel de referencia es de 0 pM.

Los niveles de progastrina pueden medirse mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica.

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 de dicha molécula de unión a progastrina a la progastrina.

Cuando los niveles de expresión se miden a nivel de proteína, esto puede realizarse en particular utilizando moléculas específicas que se unen a la progastrina, como por ejemplo anticuerpos, en particular utilizando tecnologías bien conocidas como tinción de membrana celular utilizando biotilación u otras técnicas equivalentes seguidas de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos, transferencia Western, ELISA o ELISPOT, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), inmunohistoquímica (IHC), inmunofluorescencia (IF), microarrays de anticuerpos o microarrays de tejido acoplados a inmunohistoquímica. Otras técnicas adecuadas incluyen FRET o BRET, procedimientos microscópicos de células individuales o histoquímicos que utilizan longitudes de onda de excitación únicas o múltiples y aplican cualquiera de los procedimientos ópticos adaptados, como procedimientos electroquímicos (técnicas de voltametría y amperometría), microscopía de fuerza atómica y procedimientos de radiofrecuencia, por ejemplo espectroscopia de resonancia multipolar, confocal y no confocal, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, elipsometría, un procedimiento de espejo resonante, un procedimiento de guía de onda de acoplador de rejilla o interferometría), ELISA celular, citometría de flujo, radioisotópica, imágenes por resonancia magnética, análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); espectroscopia de masas HPLC; cromatografía líquida/espectrometría de masas/espectrometría de masas (LC-MS/MS)). Todas estas técnicas son bien conocidas en la técnica y no es necesario detallarlas aquí. Estas diferentes técnicas se pueden utilizar para medir los niveles de progastrina.

Las moléculas de unión a progastrina descritas en este documento, especialmente los anticuerpos anti-progastrina, son particularmente útiles en un inmunoensayo. El inmunoensayo puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunodifusión o un ensayo de inmunodetección, como un ensayo de resistencia a plasmones de superficie (por ejemplo, un ensayo Biacore®), un ELISPOT, slot-blot o un western blot. Como guía general para dichas técnicas, véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds) (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley and Sons, Nueva York, N.Y.

Los anticuerpos son reactivos clave en numerosas técnicas de ensayo utilizadas en campos médicos, veterinarios y otros campos de inmunodetección. Dichas pruebas incluyen muchas técnicas de inmunoensayo utilizadas de forma rutinaria, tales como, por ejemplo, ensayos ELISA ligados a enzimas, RIA, IHC e IF. El nivel de progastrina se ensaya preferentemente por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica usando anticuerpos dirigidos contra dicha proteína. Preferentemente, el nivel de progastrina se determina usando un ensayo inmunoenzimático, preferentemente basado en técnicas elegidas entre RIA y ELISA, con al menos una molécula de unión a progastrina. Más preferentemente, dicho nivel se determina mediante ELISA con al menos una molécula de unión a progastrina. Más preferentemente, el nivel de progastrina se mide con una molécula de unión a progastrina, usando un ensayo inmunoenzimático, más preferentemente un ensayo ELISA.

En un aspecto particularmente útil, el procedimiento para evaluar el riesgo de aparición de un cáncer comprende determinar el nivel de progastrina en una muestra biológica de un sujeto utilizando un ensayo inmunoenzimático,

preferentemente basado en técnicas elegidas entre RIA y ELISA, con una molécula de unión a progastrina.

Estas técnicas son particularmente útiles, ya que permiten al experto en la materia ensayar la presencia de progastrina mediante una prueba sencilla, reproducible y fiable. El procedimiento de la técnica anterior se basaba en una prueba semicuantitativa, es decir, la tinción IHC de las células epiteliales en todo el pólipo. Este procedimiento es poco fiable. En particular, debido al grado de subjetividad asociado con el ensayo, es difícil comparar los resultados obtenidos por diferentes patólogos. En cambio, el presente procedimiento es totalmente cuantitativo, objetivo y muy sensible.

En otro aspecto particularmente útil, el procedimiento descrito en este documento comprende determinar el nivel de progastrina en una muestra biológica de un sujeto utilizando un ensayo inmunoenzimático, preferentemente basado en técnicas elegidas entre RIA y ELISA, con una molécula de unión a progastrina.

De este modo, el nivel de progastrina se determina en la etapa a) del presente procedimiento determinando la cantidad de progastrina que está unida a una molécula de unión a progastrina, preferentemente mediante un anticuerpo que reconoce progastrina.

Por "molécula de unión a progastrina", se hace referencia en el presente documento a cualquier molécula que se une a progastrina, pero no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly). La molécula de unión a progastrina puede ser cualquier molécula de unión a progastrina, como, por ejemplo, una molécula de anticuerpo o una molécula de receptor. Preferentemente, la molécula de unión a progastrina es un anticuerpo anti-progastrina o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Por "unión", "se une" o similares, se entiende en el presente documento que el anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, forma un complejo con un antígeno que, en condiciones fisiológicas, es relativamente estable. Los procedimientos para determinar si dos moléculas se unen entre sí son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. En particular, dicho anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, se une a la progastrina con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad para unirse a una molécula no específica como BSA o caseína. Más particularmente, dicho anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, se une únicamente a la progastrina.

Preferentemente, una muestra biológica del sujeto se pone en contacto con al menos una molécula que se une a la progastrina, en donde la afinidad de dicho agente por la progastrina es de al menos 100 nM, al menos 90 nM, al menos 80 nM, al menos 70 nM, al menos 60 nM, al menos 50 nM, al menos 40 nM, al menos 30 nM, al menos 20 nM, al menos 10 nM, al menos 5 nM, al menos 1 nM, al menos 100 pM, al menos 10 pM o al menos 1 pM, según se determina mediante un procedimiento como el descrito anteriormente.

Preferentemente, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para evaluar el riesgo de aparición de un cáncer en un sujeto que no ha sido diagnosticado previamente con cáncer, que comprende la detección de la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto que no ha sido diagnosticado con cáncer, en donde dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo anti-hPG, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En particular, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para el pronóstico del cáncer, que comprende la detección de la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto que no ha sido diagnosticado con cáncer, en donde dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo anti-hPG, o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en el presente documento pretende incluir anticuerpos policlonales y monoclonales. Un anticuerpo (o "inmunoglobulina") consiste en una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (o dominio) (abreviada en el presente documento 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 (abreviada en el presente documento 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 además en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) o "regiones hipervariables", que son principalmente responsables de la unión de un epítipo de un antígeno, y que están intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento. Los anticuerpos pueden ser de diferentes isotipos (a saber, IgA, IgD, IgE, IgG o IgM).

Más particularmente, dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, 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.

Además, un experto en la técnica de generación de anticuerpos seleccionará e implementará fácilmente un procedimiento para generar anticuerpos policlonales y/o monoclonales contra un antígeno determinado. Asimismo, un experto en la materia conoce un procedimiento para determinar los CDR dentro de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo.

Un "anticuerpo policlonal" es un anticuerpo que se produce entre o en presencia de uno o más anticuerpos no idénticos. En general, los anticuerpos policlonales se producen a partir de un linfocito B en presencia de varios otros linfocitos B que producen anticuerpos no idénticos. Por lo general, los anticuerpos policlonales se obtienen directamente de un animal inmunizado.

El término "anticuerpo monoclonal" designa un anticuerpo que surge de una población de anticuerpos casi homogénea, en la que la población comprende anticuerpos idénticos a excepción de unas pocas posibles mutaciones naturales que pueden encontrarse en proporciones mínimas. Un anticuerpo monoclonal surge del crecimiento de un clon de una sola célula, como un hibridoma, y se caracteriza por cadenas pesadas de una clase y subclase, y cadenas ligeras de un tipo. Los anticuerpos monoclonales anti-progastrina humana (anti-hPG) y su uso para diagnóstico o terapia ya son conocidos en la técnica, véase por ejemplo, WO 2011/083 088 para cáncer colorrectal, WO 2011/083 090 para cáncer de mama, WO 2011/083 091 para cáncer de páncreas, WO 2011/116 954 para cáncer colorrectal y gastrointestinal, y WO 2012/013 609 y WO 2011/083089 para patologías hepáticas.

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

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

Los "fragmentos de unión a antígeno" pueden seleccionarse, sin limitación, en el grupo que consiste en fragmentos o diacuerpos Fv, scFv (sc por cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o proteínas de fusión con péptidos desordenados tales como XTEN (polipéptido recombinante extendido) o motivos PAS, o cualquier fragmento del cual el tiempo de vida media se incrementaría por modificación química, tal como la adición de poli(alquilen)glicol tal como poli(etilen)glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" para poli(etileno)glicol), o por incorporación en un liposoma, teniendo dichos fragmentos al menos una de las CDR características del anticuerpo. Preferentemente, dichos "fragmentos de unión a antígeno" estarán constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del que derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para conservar la misma especificidad de unión que el anticuerpo del que descende y una afinidad suficiente, preferentemente al menos igual a 1/100, de forma más preferente a al menos 1/10, de la afinidad del anticuerpo del que descende, con respecto al objetivo.

En otro aspecto particular, una muestra biológica de un sujeto se pone en contacto con al menos un anticuerpo de unión a progastrina, donde dicho anticuerpo ha sido obtenido mediante un procedimiento de inmunización conocido por un experto en la materia, donde se utiliza como inmunógeno un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende la totalidad o una parte de la secuencia de aminoácidos de la progastrina. Dicho anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Cuando se utiliza más de un anticuerpo (por ejemplo, 2), el procedimiento descrito en este documento se puede llevar a cabo solo con anticuerpos del mismo tipo (por ejemplo, dos anticuerpos monoclonales) o con anticuerpos que pertenecen a diferentes tipos (por ejemplo, un monoclonal y uno policlonal).

En otro aspecto particular, dicha muestra biológica se pone en contacto con uno de dichos anticuerpos. Más particularmente, dicho inmunógeno comprende un péptido elegido entre:

- un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos de progastrina de longitud completa, y particularmente progastrina humana de longitud completa de la SEQ ID NO: 1,
- un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte de la secuencia de aminoácidos de progastrina, y particularmente progastrina humana de longitud completa de la SEQ ID NO: 1,
- 5 • un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte o a la secuencia de aminoácidos completa de la parte N-terminal de progastrina, y en particular péptidos que comprenden, o consisten en, la secuencia de aminoácidos: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 2), y
- un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte o a la secuencia de aminoácidos completa de la parte C-terminal de progastrina, y en particular péptidos que comprenden, o consisten en, la secuencia de aminoácidos: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 3),
- 10 • un péptido cuya secuencia de aminoácidos corresponde a una parte de la secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de progastrina, y en particular péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40) correspondiente a los aminoácidos 71-80 de progastrina

La persona experta se dará cuenta fácilmente de que tal inmunización se puede usar para generar anticuerpos policlonales o monoclonales, según se desee. Los procedimientos para obtener cada uno de estos tipos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que se generaron usando un inmunógeno que comprende la secuencia de aminoácidos "SWKPRSQQPDAPLG", correspondiente a la secuencia de aminoácidos 1-14 de la progastrina humana (extremidad N-terminal) incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales designados como: mAb3, mAb4, mAb16, y mAb19 y mAb20, como se describe en la siguiente Tabla 1 a la Tabla 4. Se han descrito otros anticuerpos monoclonales, aunque no está claro si estos anticuerpos realmente se unen a la progastrina (documento WO 2006/032980). Los resultados experimentales del mapeo de epítomos muestran que mAb3, mAb4, mAb16, y mAb19 y mAb20 se unen específicamente a un epítipo dentro de dicha secuencia de aminoácidos N-terminal de hPG. Los anticuerpos policlonales que reconocen específicamente un epítipo dentro del N-terminal de progastrina representado por la SEQ ID NO: 2, se han descrito en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/083088).

Tabla 1

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEQ ID NO:
6B5B11C10	mAb3	VH CDR 1	GYIFTSYW	SEQ ID NO: 4
		VH CDR 2	FYPGNSDS	SEQ ID NO: 5
		VH CDR 3	TRRDSPQY	SEQ ID NO: 6
		VL CDR 1	QSIVHSNGNTY	SEQ ID NO: 7
		VL CDR 2	KVS	SEQ ID NO: 8
		VL CDR 3	FQGSHVPFT	SEQ ID NO: 9

Tabla 2

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEQ ID NO:
20D2C3G2	mAb4	VH CDR 1	GYTFSSW	SEQ ID NO: 10
		VH CDR 2	FLPGSGST	SEQ ID NO: 11
		VH CDR 3	ATDGNVDWFAY	SEQ ID NO: 12
		VL CDR 1	QSLVHSSGVTY	SEQ ID NO: 13

		VL CDR 2	KVS	SEQ ID NO: 14
		VL CDR 3	SQSTHVPPT	SEQ ID NO: 15

Tabla 3

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEQ ID NO:
1E9D9B6	mAb16	VH CDR 1	GYTFTSY	SEQ ID NO: 16
		VH CDR 2	INPSNGGT	SEQ ID NO: 17
		VH CDR 3	TRGGYYPFDY	SEQ ID NO: 18
		VL CDR 1	QSLDSDGKTY	SEQ ID NO: 19
		VL CDR 2	LVS	SEQ ID NO: 20
		VL CDR 3	WQGTHTSPYT	SEQ ID NO: 21

Tabla 4

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEQ ID NO:
1B3B4F11	mAb19	VH CDR 1	GYSITSDYA	SEQ ID NO: 22
		VH CDR 2	ISFSGYT	SEQ ID NO: 23
		VH CDR 3	AREVNYGDSYHFDY	SEQ ID NO: 24
		VL CDR 1	SQHRTYT	SEQ ID NO: 25
		VL CDR 2	VKKDGSH	SEQ ID NO: 26
		VL CDR 3	GVGDAIKQSVFV	SEQ ID NO: 27

5

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que pueden generarse usando un inmunógeno que comprende la secuencia de aminoácidos "QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN", (parte C-terminal de progastrina) correspondiente a la secuencia de aminoácidos 55-80 de la progastrina humana incluyen, pero no se limitan a anticuerpos designados como: mAb8 y mAb13 en las siguientes Tablas 5 y 6. Los resultados experimentales del mapeo de epítopos muestran que mAb13 se une específicamente a un epítipo dentro de dicha secuencia de aminoácidos hPG C-terminal.

10

Tabla 5

Depósito de hibridoma	mAb	Secuencias de aminoácidos		SEQ ID NO:
1C10D3B9	mAb8	VH CDR 1	GFTFTTYA	SEQ ID NO: 28
		VH CDR 2	ISSGGTYT	SEQ ID NO: 29
		VH CDR 3	ATQGNYSLDF	SEQ ID NO: 30
		VL CDR 1	KSLRHTKGITF	SEQ ID NO: 31
		VL CDR 2	QMS	SEQ ID NO: 32

		VL CDR 3	AQNLELPLT	SEQ ID NO: 33
--	--	----------	-----------	---------------

Tabla 6

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

Otros ejemplos incluyen anticuerpos monoclonales y/o policlonales anti-hPG generados mediante el uso de un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

Más particularmente, en un procedimiento descrito en el presente documento, dicha muestra biológica se pone en contacto con al menos un anticuerpo anti-hPG o un fragmento de unión al antígeno del mismo, preferentemente con un anticuerpo anti-hPG o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo anti-hPG se elige entre anticuerpos anti-hPG N-terminales y anticuerpos anti-hPG C-terminales.

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

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

En un aspecto particular del procedimiento divulgado en este documento, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal elegido del grupo que consiste en:

- Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente,
- Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5 y

6, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente,

- Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente,

- Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente,

- Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente al menos tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 28, 29 y 30, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 28, 29 y 30, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 31, 32 y 33, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 31, 32 y 33, respectivamente

- Un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 34, 35 y 36, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 34, 35 y 36, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos uno, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente, y

- Un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158.

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad" o "% de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se refiere al porcentaje de nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de un alineamiento óptimo, siendo este porcentaje puramente estadístico y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias después de haberlas alineado óptimamente, pudiendo dicha comparación realizarse por segmento o utilizando una "ventana de alineamiento". El alineamiento óptimo de las secuencias a comparar puede realizarse, además de mediante la comparación manual, mediante procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

Para la secuencia de aminoácidos que muestra al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferentes incluyen aquellos que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una delección, adición o sustitución de al menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se

prefieren las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". Aquí, la expresión "aminoácidos equivalentes" pretende indicar cualquier aminoácido que probablemente sea sustituido por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar, sin embargo, las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de los ejemplos específicos definidos a continuación.

- 5 Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse ya sea por su homología estructural con los aminoácidos por los que se sustituyen o por los resultados de pruebas comparativas de actividad biológica entre los diversos anticuerpos que probablemente se generen.

En otro aspecto particular, el anticuerpo utilizado en el procedimiento divulgado en este documento es un anticuerpo humanizado.

- 10 Como se usa en el presente documento, "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, y las demás partes de la molécula del anticuerpo se derivan de uno o varios anticuerpos humanos. Además, algunos de los residuos del segmento esquelético (denominados FR por marco) se pueden modificar si es necesario para preservar la afinidad de unión, mediante el uso de técnicas bien conocidas por el experto en la materia (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986). El objetivo de la humanización es una reducción de la
15 inmunogenicidad de un anticuerpo xenogénico, como un anticuerpo murino, para su introducción en un ser humano, manteniendo al mismo tiempo la afinidad de unión al antígeno y la especificidad completas del anticuerpo.

- Los anticuerpos se pueden humanizar utilizando una variedad de técnicas que incluyen injerto de CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; Patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o recubrimiento de la superficie (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; Roguska M.A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973) y reordenamiento de cadenas (Patente de Estados Unidos No. 5.530.101; y 5.585.089). 5.565.332). Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos los procedimientos de presentación de fagos. Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y las publicaciones de solicitudes de patente internacionales números WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO
20 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/107411.

En un aspecto más particular, el anticuerpo utilizado en el presente procedimiento es un anticuerpo humanizado elegido del grupo que consiste en:

- Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente,
30
- Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente,
35 40
- Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente,
45 50
- Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad

después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente,

- Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 28, 29 y 30, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 28, 29 y 30, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 31, 32 y 33, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 31, 32 y 33, respectivamente, y
- Un anticuerpo humanizado que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 34, 35 y 36, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 34, 35 y 36, respectivamente, y una cadena ligera que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, preferentemente tres, de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente, o secuencias con al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente,

donde dicho anticuerpo también comprende regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano.

En un primer aspecto, un procedimiento descrito en el presente documento comprende poner en contacto una muestra biológica con al menos un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, preferentemente un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, en donde dicho epítipo se encuentra dentro de la parte C-terminal de hPG. Alternativamente, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra biológica con al menos un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, preferentemente un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, en donde dicho epítipo se encuentra dentro de la parte N-terminal de hPG.

Más específicamente, un procedimiento divulgado en este documento comprende poner en contacto una muestra biológica con al menos un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, preferentemente un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, en donde dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de progastrina elegida 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 donde la secuencia de aminoácidos de hPG es SEQ ID NO: 1.

Más específicamente, un procedimiento divulgado en este documento comprende poner en contacto una muestra biológica con al menos un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, preferentemente un anticuerpo anti-hPG que se une a un epítipo de hPG, en donde dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de progastrina, elegida entre una secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 71 a 74 de hPG, los aminoácidos 69 a 73 de hPG, los aminoácidos 71 a 80 de hPG (SEQ ID NO: 40), los aminoácidos 76 a 80 de hPG y los aminoácidos 67 a 74 de hPG, en donde la secuencia de aminoácidos de hPG es SEQ ID NO: 1.

En particular, el procedimiento comprende una etapa de poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con un primer agente que se une a una primera parte de progastrina y con un segundo agente que se une a una segunda parte de progastrina. En una 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 progastrina y con un segundo anticuerpo que se une a un segundo epítipo de progastrina.

Preferentemente, dicho primer anticuerpo está unido a un vehículo insoluble o parcialmente soluble. La unión de progastrina por dicho primer anticuerpo da como resultado la captura de progastrina de dicha muestra biológica. Preferentemente, dicho primer anticuerpo es un anticuerpo que se une a un epítipo de hPG, en donde dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de progastrina, como se describió anteriormente. Más preferentemente, dicho primer anticuerpo es el anticuerpo monoclonal Mab14, producido por el hibridoma 2H9F4B7, descrito en WO 2011/083088. El hibridoma 2H9F4B7 fue depositado en virtud del Tratado de Budapest en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 París CEDEX 15, Francia,

el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158.

Preferentemente, dicho segundo anticuerpo está marcado con una fracción detectable, como se describe a continuación. La unión de progastrina por el segundo anticuerpo permite la detección de las moléculas de progastrina que estaban presentes en la muestra biológica. Además, la unión de progastrina por el segundo anticuerpo permite la cuantificación de las moléculas de progastrina que estaban presentes en la muestra biológica. Preferentemente, dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo que se une a un epítipo de hPG, en donde dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de progastrina, como se describió anteriormente. Más preferentemente, dicho anticuerpo N-terminal es un anticuerpo policlonal, como se describió anteriormente. Alternativamente, también es posible utilizar un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo dentro del extremo terminal N de progastrina, tal como, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales N-terminales descritos anteriormente, en particular un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21.

Preferentemente, el primer anticuerpo está unido a un vehículo insoluble o parcialmente soluble y el segundo anticuerpo está marcado con una fracción detectable.

En particular, el procedimiento comprende la determinación de la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano al que nunca se le ha diagnosticado previamente cáncer.

En particular, el procedimiento comprende la determinación de la concentración de progastrina en una muestra biológica de un sujeto humano que nunca ha sido diagnosticado previamente con cáncer, en donde dicha muestra biológica se selecciona entre sangre, suero y plasma.

Más particularmente, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra de plasma de dicho sujeto con al menos un anticuerpo anti-hPG, en particular con un anticuerpo anti-hPG, y determinar la concentración de progastrina en dicha muestra, en donde una concentración de progastrina superior a 10 pM en dicho plasma es indicativa de un riesgo de desarrollar cáncer en dicho sujeto. En otras palabras, una concentración de progastrina superior a 10 pM en dicho plasma es indicativa de un mal pronóstico en dicho sujeto.

Aún más preferentemente, el procedimiento divulgado en este documento comprende poner en contacto una muestra de plasma de dicho sujeto con al menos un anticuerpo anti-hPG, en particular con un anticuerpo anti-hPG, y determinar la concentración de progastrina en dicha muestra, en donde una concentración de progastrina superior a 10 pM, preferentemente a 20 pM, más preferentemente a 30 pM, todavía más preferentemente a 40 pM, incluso más preferentemente a 50 pM en dicha muestra de plasma es indicativa de un riesgo de desarrollar cáncer en dicho sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar un cáncer en un paciente que nunca ha sido diagnosticado con cáncer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

a) evaluar el riesgo de que dicho paciente desarrolle un cáncer por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente; y

b) tratar dicho cáncer si existe riesgo de acuerdo con a).

El procedimiento descrito en este documento es particularmente ventajoso porque permite identificar los cánceres en una etapa muy temprana. Se sabe en la técnica que cuanto más temprana sea la identificación del cáncer, mayores serán las posibilidades de remisión. Además, el paciente puede ser tratado con medicamentos contra el cáncer que no sean demasiado agresivos, lo que reduce las posibilidades de efectos secundarios al tiempo que mantiene la eficacia terapéutica.

En particular, un procedimiento descrito en el presente documento comprende comparar la concentración de progastrina en una muestra biológica obtenida de un paciente con un valor predeterminado de concentración de progastrina en la muestra. Más particularmente, dicho valor predeterminado se elige entre: una media o promedio de valores de muestra basados en la determinación de la media o promedio del valor en una población libre de cáncer, un valor de concentración de progastrina obtenido cuando se sabía que el paciente estaba libre de cáncer.

En otro aspecto más, la divulgación también proporciona una composición para su uso en los procedimientos descritos anteriormente. Según este aspecto, la composición es para evaluar el riesgo de aparición de cáncer en un sujeto al que nunca se le ha diagnosticado cáncer previamente, en donde dicha composición comprende al menos un anticuerpo de unión a progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En un primer aspecto, una composición divulgada en este documento comprende un anticuerpo que reconoce un epítipo

que incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de progastrina.

Más específicamente, una composición divulgada en este documento comprende un anticuerpo que reconoce un epítipo de progastrina, en donde dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte N-terminal de progastrina, en donde 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 donde la secuencia de aminoácidos de hPG es SEQ ID NO: 1.

Más específicamente, una composición divulgada en este documento comprende un anticuerpo que reconoce un epítipo de progastrina en donde dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de progastrina, en donde 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 (SEQ ID NO: 40), los residuos 76 a 80 de hPG, o los residuos 67 a 74 de hPG, en donde la secuencia de aminoácidos de hPG es SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un kit útil para los procedimientos descritos anteriormente, comprendiendo dicho kit cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. Los materiales envasados que comprenden una combinación de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar los procedimientos descritos anteriormente, por ejemplo, kits, también están dentro del alcance de la divulgación. Preferentemente, dicho kit comprende al menos un anticuerpo descrito en el presente documento, más preferentemente dos.

Por ejemplo, dicho kit comprende un primer anticuerpo unido a un vehículo insoluble o parcialmente soluble. Preferentemente, dicho primer anticuerpo es un anticuerpo que se une a un epítipo de hPG, en el que dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos dentro de la parte C-terminal de la progastrina, como se ha descrito anteriormente. Más preferentemente, dicho primer anticuerpo es el anticuerpo monoclonal Mab14, producido por el hibridoma 2H9F4B7, descrito en el documento WO 2011/083088. El hibridoma 2H9F4B7 se depositó en virtud del Tratado de Budapest en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158. Alternativamente, los anticuerpos policlonales o monoclonales, o fragmentos de unión al antígeno o derivados de los mismos, como se detalla en el presente documento, se proporcionan marcados con una fracción detectable, de modo que se puedan envasar y utilizar, por ejemplo, en kits, para identificar células que tienen el antígeno mencionado anteriormente, ya sea antes de la secreción o unido al receptor de progastrina. Los ejemplos no limitantes de dichas etiquetas incluyen fluoróforos tales como isotiocianato de fluoresceína; cromóforos, radionúclidos, biotina o enzimas. Dichos anticuerpos marcados o fragmentos de unión se pueden utilizar para la localización histológica del antígeno, ELISA, clasificación celular, así como otras técnicas inmunológicas para detectar o cuantificar progastrina, y células que portan este antígeno, por ejemplo. Preferentemente, dicho anticuerpo marcado es un anticuerpo que se une a un epítipo de hPG, en donde dicho epítipo incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia de aminoácidos dentro de la parte N-terminal de progastrina, como se describió anteriormente. Más preferentemente, dicho anticuerpo N-terminal es un anticuerpo policlonal, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, también es posible utilizar un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo dentro del extremo terminal N de la progastrina, como por ejemplo los anticuerpos monoclonales N-terminales descritos anteriormente, en particular un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21.

Por lo tanto, lo más preferente es que el kit descrito en este documento comprenda:

- un primer anticuerpo anti-progastrina, en donde dicho anticuerpo es en donde dicho primer anticuerpo anti-progastrina es un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, bajo la referencia I-5158; y
- un segundo anticuerpo anti-progastrina, en donde dicho segundo anticuerpo anti-progastrina es un anticuerpo policlonal que se une a un epítipo dentro del extremo terminal N de progastrina o un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente.

La divulgación incluye kits en los que el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo, está marcado.

Los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración adecuada.

El kit contiene los anticuerpos para la detección y cuantificación de progastina in vitro, por ejemplo, en un ELISA o en un Western blot. El anticuerpo descrito en el presente documento puede proporcionarse en un kit para la detección y cuantificación de progastina in vitro, por ejemplo, en un ELISA o en un Western blot. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos, como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Un kit de este tipo puede comprender un receptáculo que está compartimentado para recibir uno o más recipientes, como viales, tubos y similares, y dichos recipientes contienen elementos separados. Por ejemplo, un recipiente puede contener un primer anticuerpo unido a un portador insoluble o parcialmente soluble. Un segundo recipiente puede contener un segundo anticuerpo soluble, marcado de forma detectable, en forma liofilizada o en solución. El receptáculo también puede contener un tercer recipiente que contiene un tercer anticuerpo marcado de forma detectable en forma liofilizada o en solución. Un kit de esta naturaleza se puede utilizar en el ensayo sándwich descrito en el presente documento. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso in vitro o diagnóstico previsto.

También se proporcionan kits para su uso como control positivo para la purificación o inmunoprecipitación de progastina a partir de células. Para el aislamiento y la purificación de progastina, el kit puede contener el anticuerpo descrito en el presente documento, o un fragmento de unión al antígeno o derivado del mismo, acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de sefarsa). Se pueden proporcionar kits que contienen los anticuerpos para la detección y cuantificación de progastina in vitro o ex vivo, por ejemplo en un ELISA o una inmunotransferencia Western. El kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre el recipiente o asociado con el mismo. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo, o fragmento de unión o derivado del mismo, descrito en el presente documento. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones, anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso in vitro o diagnóstico previsto.

También se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un producto/programa informático que contiene un conjunto de instrucciones características de la implementación del procedimiento inventivo.

También se describe, pero no forma parte de la invención reivindicada, un sistema de procesamiento que incluye una unidad de cálculo y una interfaz de entrada, caracterizado porque dicho sistema incluye medios para implementar el procedimiento para determinar el riesgo de desarrollar cáncer como se describe en el presente documento.

En referencia a la Figura 13, un dispositivo (1) según un aspecto particular incluye una unidad de cálculo (10) capaz de seguir instrucciones de ordenador y procesar datos. Una de dichas unidades de cálculo incluye preferentemente un microprocesador (110), que puede ser de cualquier tipo conocido en el estado de la técnica. La unidad de cálculo (10) dispone también de una unidad de almacenamiento (100) capaz de recibir un programa informático que incluye un conjunto de instrucciones características de la implementación del procedimiento, y capaz de almacenar datos.

El dispositivo (1) comprende además una interfaz de entrada (12) conectada a la unidad de cálculo (10) que permite a un operador (O) del dispositivo (1) introducir datos a tratar. Una de dichas interfaces de entrada (12) comprende cualquier elemento que permita la introducción de dichos datos destinados a la unidad de cálculo (10) como por ejemplo un elemento de teclado asociado opcionalmente a un elemento de dispositivo señalador.

Preferentemente, la unidad de cálculo incluye además una interfaz de salida (14) tal como una pantalla que por una parte permite al usuario verificar la integridad de los datos introducidos pero por otra parte permite a la unidad de cálculo (10) poder interactuar con el operador (O).

El dispositivo (1) puede estar integrado en un único sistema, como una computadora, un teléfono inteligente o cualquier otro conocido en el estado de la técnica, que permita la implementación del procedimiento de la invención. El operador (O) puede tener cualquier nivel de habilidad y, por tanto, puede tener o no cualificación médica.

Se prevé en particular que los datos introducidos por el operador (O) sean enviados a través de una red (Internet, por ejemplo) preferentemente de manera segura a un servidor remoto que comprende una unidad de cálculo capaz de implementar el procedimiento de la invención y, por lo tanto, de tratar los datos recibidos por el servidor. Opcionalmente, después de dicho tratamiento, el servidor devuelve el resultado del análisis al usuario a través de la misma red o de otra. Opcionalmente, el servidor registra los datos y/o el resultado del análisis en un medio de registro. Evidentemente, se pueden prever medios que garanticen el anonimato de las características fisiológicas/clínicas del donante y del receptor.

De este modo, un dispositivo de este tipo (1) permite la implementación del presente procedimiento, es decir, permite la implementación de las siguientes etapas:

- introducir características fisiológicas/clínicas mediante la interfaz de entrada (12) en una unidad de cálculo (10) (etapa 22), incluyendo dichas características el nivel de progastina en la muestra (10) (etapa 23),

- normalizar opcionalmente dicho nivel de progastrina mediante el procesamiento de datos por la unidad de cálculo (10) (etapa 24), y
- analizar dicha puntuación de riesgo para determinar el riesgo de desarrollo de cáncer (etapa 25).

5 De esta forma, el procedimiento aquí descrito puede ser implementado no sólo por personal clínico u hospitalario sino también por todas las personas involucradas en la investigación clínica (industria farmacéutica, científicos, médicos, etc.) o incluso por el público en general.

Legendas de las figuras

- Figura 1: Curva característica operativa del receptor (ROC) para el cáncer colorrectal (panel superior) con el área bajo la curva ROC y el análisis estadístico (panel inferior).
- 10 Figura 2: mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con cáncer colorrectal (n=148) y en pacientes control (n=103) usando una combinación de un anticuerpo policlonal N-terminal y un anticuerpo policlonal C-terminal - prueba de Mann Whitney de dos colas, *** p <0,0001.
- Figura 3: Curva característica operativa del receptor (ROC) para el carcinoma hepatocelular (panel superior) con el área bajo la curva ROC y el análisis estadístico (panel inferior).
- 15 Figura 4: mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con carcinoma hepatocelular (n=47) y en pacientes control (n=103) usando una combinación de un anticuerpo policlonal N-terminal y un anticuerpo policlonal C-terminal - prueba de Mann Whitney de dos colas, ***p<0,0001
- Figura 5: Curva de característica operativa del receptor (ROC) para el cáncer esofágico (panel superior) con el área bajo la curva ROC y el análisis estadístico (panel inferior).
- 20 Figura 6: mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con cáncer esofágico (n=12) y en pacientes control (n=103) usando una combinación de un anticuerpo policlonal N-terminal y un anticuerpo policlonal C-terminal - prueba de Mann Whitney de dos colas, ***p<0,0001
- Figura 7: Curva característica operativa del receptor (ROC) para el cáncer gástrico (panel superior) con el área bajo la curva ROC y el análisis estadístico (panel inferior).
- 25 Figura 8: mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con cáncer gástrico (n=15) y en pacientes control (n=103) usando una combinación de un anticuerpo policlonal N-terminal y un anticuerpo policlonal C-terminal - prueba de Mann Whitney de dos colas, ***p<0,001
- Figura 9: Curva característica operativa del receptor (ROC) para el cáncer de páncreas (panel superior) con el área bajo la curva ROC y el análisis estadístico (panel inferior).
- 30 Figura 10: mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con cáncer de páncreas (n=44) y en pacientes control (n=103) usando una combinación de un anticuerpo policlonal N-terminal y un anticuerpo policlonal C-terminal - prueba de Mann Whitney de dos colas, ***p<0,0001
- Figura 11: Curva característica operativa del receptor (ROC) para el cáncer de ovario (panel superior) con el área bajo la curva ROC y el análisis estadístico (panel inferior).
- 35 Figura 12: mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con cáncer de ovario (n=8), y en pacientes control (n=103) usando una combinación de un anticuerpo policlonal N-terminal y un anticuerpo policlonal C-terminal.
- Figura 13: Representación esquemática de un sistema de procesamiento según un aspecto particular que no forma parte de la invención reivindicada.
- 40 Figura 14: Gráfico funcional que representa un procedimiento según un aspecto particular.
- Figura 15: Mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con diversos tipos de cáncer (n=231), y en pacientes control (n=322) usando una combinación de un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal.
- 45 Figura 16: Mediana de la concentración plasmática de progastrina en pacientes con diversos tipos de cáncer (n=10), usando una combinación de un anticuerpo policlonal y anticuerpo monoclonal (mAb-pAb) o una

combinación de anticuerpos monoclonales (mAb-mAb) - prueba de Mann Whitney de dos colas, NS $p>0,05$.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Detección de la concentración plasmática de progastrina usando anticuerpos policlonales

- 5 Los niveles plasmáticos de progastrina se cuantificaron mediante ELISA mediante el uso de dos anticuerpos anti-progastrina específicos: los anticuerpos de captura recubren los pocillos de la placa, mientras que los anticuerpos de revelación se utilizan para detectar progastrina y median la revelación de la señal.

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

10 **Material**

Reactivos y aparatos se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7

Designación	Proveedor	Referencia
Placas blancas MaxiSORP Nunc, 96 pozos	Dutscher	# 055221
Carbonato de sodio/bicarbonato de sodio	Sigma	# 21851
DPBS 1X	Lonza	# P04-36500
Tween-20	Biosolve	# 20452335
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
Estreptavidina-HRP	Pierce (Thermo)	# 21130
Sustrato de sensibilidad máxima SuperSignal ELISA Femto	Pierce (Thermo)	# 37074
Anticuerpo policlonal Anti-Progastrina	Eurogentec	/

- 15 Los anticuerpos policlonales se obtuvieron inmunizando un conejo con progastrina N-terminal (SEQ ID NO: 2) o con progastrina C-terminal correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de hPG y que tiene la secuencia FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), según protocolos estándar.

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

- 20 Se recubren placas de 96 pocillos preparando una solución de carbonato - bicarbonato de sodio, 50 mM pH 9,6 disolviendo el contenido de una cápsula en 100 ml de agua MilliQ. Se prepara una solución de anticuerpo de captura (3 mg/ml), correspondiente a anticuerpos policlonales obtenidos utilizando el extremo terminal C de la progastrina FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40) en tampón de carbonato. Se añaden 100 microlitros de solución de anticuerpos a cada pocillo y se incuba a 4 °C durante 16 horas (1 noche). A continuación, se bloquean las placas eliminando la solución de anticuerpos y se lavan 3 veces con 300 ml de 1X PBS / 0,1% Tween-20, añadiendo luego 200 ml de tampón de bloqueo (1X PBS / 0,1% Tween-20 / 0,1% BSA) por pocillo, y se incuban 2 horas a 22 °C. Luego se elimina el tampón de bloqueo y se lavan los pocillos 3 veces con 300 ml de PBS 1X / Tween-20 al 0,1 %.

La dilución del plasma se realiza de la siguiente manera: el plasma se utiliza puro, diluido 1/2, 1/5 y 1/10. Las diluciones se preparan a partir de plasma puro en 1X PBS / 0,1% Tween 20 / 0,1% BSA.

- 30 Para la prueba de control, ELISA en presencia de una concentración conocida de progastrina, se prepara una dilución de progastrina de la siguiente manera: se prepara PG recombinante de reserva (progastrina humana de longitud completa producida en E. coli y purificada por afinidad con glutatión agarosa/eliminación de etiquetas (Tev)/purificación por contrapresión IMAC/diálisis, del Instituto Pasteur, París, Francia) a una concentración de 0,45 mg/ml (45 microM), por triplicado. Los intervalos de concentraciones de progastrina se prepararon de la siguiente manera:

- Solución A: Pre-dilución 1/10, 2 µl de solución madre + 18 µl del tampón de pH
 - Solución B: Pre-dilución 1/100, 10 µl de A + 90 µl del tampón de pH
 - Solución C: Pre-dilución 1/1000, 10 µl de B + 90 µl del tampón de pH
 - Solución D: 500 pM, 5,55 µl de C + 494,5 µl del diluyente
 - 5 • Solución E: 250 pM, 250 µl de D + 250 µl del diluyente
 - Solución F: 100 pM, 200 µl de E + 300 µl del diluyente
 - Solución G: 50 pM, 250 µl de F + 250 µl del diluyente
 - Solución H: 25 pM, 200 µl de G + 200 µl del diluyente
 - Solución I: 10 pM, 100 µl de H + 150 µl del diluyente
 - 10 El intervalo de PG recombinante es lineal y, por lo tanto, puede ser más o menos extenso según el anticuerpo utilizado.
- Para la preparación de las muestras de prueba, se separan aproximadamente 500 µl de cada muestra y se almacenan hasta el análisis (y confirmación si es necesario) de los resultados. 100 µl de cada punto del intervalo y/o plasmas se analizan puros, diluidos a 1/2, 1/5 y 1/10, y se incuban durante 2 horas a 22°C en las placas.
- Para la revelación del ensayo, las placas se lavan 3 veces con 300 ml de PBS 1X/Tween-20 al 0,1%. Se prepara una solución del anticuerpo policlonal de conejo anti-progastrina, en el que dichos anticuerpos se han obtenido utilizando la parte N-terminal de la progastrina como inmunógeno, acoplada a biotina a 0,5 mg/ml, por dilución en PBS 1X/Tween-20 al 0,1%/BSA al 0,1%. Se añaden 100 ml de esta solución a cada pocillo. La incubación se realiza durante 1 hora a 22°C. La revelación con estreptavidina-HRP se realiza retirando el anticuerpo de detección y lavando 3 veces con 300 ml de PBS 1X/Tween-20 al 0,1%, preparándose a continuación una solución de Estreptavidina-HRP a 20 ng/ml diluida en PBS 1X/Tween-20 al 0,1%/BSA al 0,1%, adicionándose 100 ml de esta solución a cada pocillo, antes de la incubación durante 1 hora a 22°C.
- La detección consiste en eliminar la estreptavidina-HRP y lavar 3 veces con 300 ml de 1X PBS/0,1% Tween-20, añadiendo después 100 ml de solución de sustrato quimioluminiscente por pocillo. La solución de sustrato se prepara mezclando volúmenes iguales de las dos soluciones SuperSignal ELISA Femto kit, 20 ml + 20 ml, 30 minutos antes de su uso y se almacena a temperatura ambiente en la oscuridad. La luminiscencia se lee tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad.
- Para cada condición, la prueba se realiza por triplicado y los resultados de los intervalos se presentarán como un gráfico que muestra el cambio en la luminiscencia en función de la concentración de progastrina. Para cada dilución plasmática, la concentración de progastrina se determina utilizando la ecuación de la línea de regresión lineal del intervalo correspondiente (intervalo 1/10 para una muestra diluida al 1/10).
- 30
- Procedimientos y resultados
- Los niveles de progastrina se determinaron en muestras de plasma de sujetos que se sabía que habían desarrollado cáncer más tarde. La progastrina se capturó con anticuerpos policlonales específicos para el extremo terminal C. La detección se realizó con anticuerpos policlonales marcados específicos para el extremo terminal N.
- 35 Es importante destacar que en el momento de la recolección de las muestras, estos sujetos nunca habían sido diagnosticados con cáncer y no presentaban ningún síntoma relacionado con el cáncer. El control estuvo constituido por muestras de plasma de la población general.
- Los resultados se muestran en las figuras 1-12. La mediana de la concentración plasmática de progastrina fue de 17 pM en pacientes que desarrollaron cáncer colorrectal posteriormente (n = 148), 100 pM en pacientes que desarrollaron carcinoma hepatocelular (n = 47), 42,3 pM en pacientes que desarrollaron cáncer de esófago (n = 12), 17,90 pM en pacientes que desarrollaron cáncer gástrico (n = 15), 16,6 pM en pacientes que desarrollaron cáncer de páncreas (n = 44) y 8,45 en pacientes que desarrollaron cáncer de ovario (n = 8). En comparación, la concentración plasmática media de progastrina es de 0 pM en sujetos de control (n = 103).
- 40
- Estos datos demuestran que los pacientes que desarrollarán cáncer tienen niveles detectables de progastrina en el plasma, mientras que los individuos de control sanos no tienen ninguno. La progastrina se puede detectar incluso antes de que se
- 45

pueda diagnosticar cualquier cáncer, lo que hace que la progastrina sea un biomarcador útil para la aparición del cáncer. El análisis ROC confirmó la naturaleza predictiva de la progastrina para cada uno de los cánceres enumerados anteriormente.

5 Estos datos demuestran que los pacientes con riesgo de desarrollar cáncer tienen una mayor concentración de progastrina en el plasma en comparación con los individuos de control sanos.

Ejemplo 2: Detección de la concentración plasmática de progastrina mediante una combinación de anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales.

10 En el presente ejemplo, los niveles plasmáticos de progastrina se cuantificaron mediante ELISA mediante el uso de un anticuerpo específico para progastrina humana (hPG) recubierto previamente en una placa de 96 pocillos. Se añaden estándares y muestras a los pocillos, y cualquier hPG presente se une al anticuerpo de captura inmovilizado. Se lavan los pocillos y se añade un conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) con anticuerpo de detección anti-hPG, lo que produce un "sándwich" anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Después de un segundo lavado, se añade la solución de sustrato TMB, que produce un color azul en proporción directa a la cantidad de hPG presente en la muestra inicial. La solución de parada cambia el color de azul a amarillo, y los pocillos se leen a 450 nm con un lector de microplacas.

15 Los anticuerpos policlonales se obtuvieron inmunizando un conejo con progastrina N-terminal (SEQ ID NO: 2) o con progastrina C-terminal correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de hPG y que tiene la secuencia FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), de acuerdo con protocolos estándar.

20 Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron utilizando hibridomas productores de anticuerpos contra progastrina N-terminal (SEQ ID NO: 2) o contra progastrina C-terminal correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de hPG y que tienen la secuencia FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), de acuerdo con protocolos estándar.

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

25 Para la prueba de control, ELISA en presencia de una concentración conocida de progastrina, se prepara una dilución de progastrina de la siguiente manera: se prepara PG recombinante de reserva (progastrina humana de longitud completa producida en E. coli y purificada por afinidad con glutatión agarosa/eliminación de etiquetas (Tev)/purificación por contrapresión IMAC/diálisis, del Instituto Pasteur, París, Francia) a una concentración de 0,45 mg/ml (45 microM), por triplicado. Los intervalos de concentraciones de progastrina se prepararon de la siguiente manera:

- Solución A: Pre-dilución 1/10, 2 µl de solución madre + 18 µl del tampón de pH
- Solución B: Pre-dilución 1/100, 10 µl de A + 90 µl del tampón de pH
- 30 • Solución C: Pre-dilución 1/1000, 10 µl de B + 90 µl del tampón de pH
- Solución D: 500 pM, 5,55 µl de C + 494.5 µl del diluyente
- Solución E: 250 pM, 250 µl de D + 250 µl del diluyente
- Solución F: 100 pM, 200 µl de E + 300 µl del diluyente
- Solución G: 50 pM, 250 µl de F + 250 µl del diluyente
- 35 • Solución H: 25 pM, 200 µl de G + 200 µl del diluyente
- Solución I: 10 pM, 100 µl de H + 150 µl del diluyente

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

Procedimientos y resultados

40 Los niveles de progastrina se determinaron en muestras de plasma de sujetos que se sabía que habían desarrollado cáncer más tarde. La progastrina se capturó con el anticuerpo monoclonal mAb 14 del extremo terminal C producido por el hibridoma 2H9F4B7 descrito en WO 2011/083088 (el hibridoma 2H9F4B7 se depositó de conformidad con el Tratado de Budapest en el CNM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 París CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158). La detección se realizó con anticuerpos policlonales marcados específicos para el extremo terminal N.

Es importante destacar que en el momento de la recolección de las muestras, estos sujetos nunca habían sido diagnosticados con cáncer y no presentaban ningún síntoma relacionado con el cáncer. El control estuvo constituido por muestras de plasma de la población general.

5 Los resultados se muestran en la figura 15. La concentración plasmática media de progastina se situó entre 2.750 y 21,5 pM en los pacientes, dependiendo del tipo de cáncer (n = 231). En comparación, la concentración plasmática media de progastina es de 0 pM en los sujetos de control (n = 322).

Estos datos demuestran que los pacientes que desarrollarán cáncer tienen niveles detectables de progastina en el plasma, mientras que los individuos de control sanos no tienen ninguno. La progastina se puede detectar incluso antes de que se diagnostique cualquier cáncer, lo que la convierte en un biomarcador útil para la aparición del cáncer.

10 Estos datos demuestran que los pacientes con riesgo de desarrollar cáncer tienen una mayor concentración de progastina en el plasma en comparación con los individuos de control sanos.

Ejemplo 3: Detección de la concentración plasmática de progastina utilizando una combinación de anticuerpos monoclonales.

15 En el presente ejemplo, los niveles plasmáticos de progastina se cuantificaron mediante ELISA mediante el uso de un anticuerpo específico para progastina humana (hPG) recubierto previamente en una placa de 96 pocillos. Se añaden estándares y muestras a los pocillos, y cualquier hPG presente se une al anticuerpo de captura inmovilizado. Se lavan los pocillos y se añade un conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) con anticuerpo de detección anti-hPG, lo que produce un "sándwich" anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Después de un segundo lavado, se añade la solución de sustrato TMB, que produce un color azul en proporción directa a la cantidad de hPG presente en la muestra inicial. La solución de
20 parada cambia el color de azul a amarillo, y los pocillos se leen a 450 nm con un lector de microplacas.

Los anticuerpos policlonales se obtuvieron inmunizando un conejo con progastina N-terminal (SEQ ID NO: 2) o con progastina C-terminal correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de hPG y que tiene la secuencia FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), según protocolos estándar.

25 Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron utilizando hibridomas productores de anticuerpos contra la progastina N-terminal (SEQ ID NO: 2) o contra la progastina C-terminal correspondiente a los aminoácidos 71 a 80 de hPG y que tienen la secuencia FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 40), de acuerdo con protocolos estándar.

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

30 Para la prueba de control, ELISA en presencia de una concentración conocida de progastina, se prepara una dilución de progastina de la siguiente manera: se prepara PG recombinante de reserva (progastina humana de longitud completa producida en E. coli y purificada por afinidad con glutatión agarosa/eliminación de etiquetas (Tev)/purificación por contrapresión IMAC/diálisis, del Instituto Pasteur, París, Francia) a una concentración de 0,45 mg/ml (45 microM), por triplicado. Los intervalos de concentraciones de progastina se prepararon de la siguiente manera:

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

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

Procedimientos y resultados

- 5 Los niveles de progastrina se determinaron en muestras de plasma de sujetos que se sabía que habían desarrollado cáncer más tarde. La progastrina se capturó con el anticuerpo monoclonal mAb 14 del extremo terminal C producido por el hibridoma 2H9F4B7 descrito en el documento WO 2011/083088 (el hibridoma 2H9F4B7 se depositó de conformidad con el Tratado de Budapest en el CNM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158). La detección se realizó con el anticuerpo monoclonal marcado mAb 16 descrito en el documento WO 2011/083088, que es específico para el extremo terminal N.
- Es importante destacar que en el momento de la recolección de las muestras, estos sujetos nunca habían sido diagnosticados con cáncer y no presentaban ningún síntoma relacionado con el cáncer. El control estuvo constituido por muestras de plasma de la población general.
- 10 Los resultados se muestran en la Fig. 16. La concentración plasmática media de progastrina utilizando mAb-pAb y mAb-mAb fue similar en mediana (8,2 frente a 6,6 pM respectivamente) y media (18,99 frente a 16,79 pM) respectivamente (n = 10).
- 15 Estos datos demuestran que las pruebas sándwich de mAb-pAb y mAb-mAb ELISA detectan progastrina en el plasma de los pacientes. Es importante destacar que no se pudo identificar ninguna diferencia significativa entre ambas pruebas. En particular, la sensibilidad de las pruebas sándwich mAb-pAb y mAb-mAb fue muy similar. Por lo tanto, la prueba sándwich mAb-mAb ELISA se puede utilizar de manera confiable para detectar progastrina en el plasma del paciente incluso antes de que se pueda diagnosticar cualquier cáncer, lo que hace que la progastrina sea un biomarcador útil para la aparición del cáncer.
- 20 Estos datos demuestran que los pacientes con riesgo de desarrollar cáncer tienen una mayor concentración de progastrina en el plasma en comparación con los individuos de control sanos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar el riesgo de aparición de un cáncer en un sujeto humano al que no se le ha diagnosticado previamente un cáncer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - a) determinar el nivel de progastrina en una muestra de dicho sujeto;
 - 5 b) determinar el riesgo de que dicho sujeto desarrolle un cáncer en función del nivel de la etapa a)en el que la determinación de la etapa a) incluye:
 - poner en contacto dicha muestra con al menos el anticuerpo monoclonal Mab14 producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 París CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158,
 - 10 - y medir la unión de dicho anticuerpo monoclonal a la progastrina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la determinación de la etapa a) incluye poner en contacto dicha muestra con al menos otra molécula de unión a progastrina, uniéndose dicha molécula de unión a progastrina a un epítipo dentro del extremo terminal N de la progastrina.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha otra molécula de unión a progastrina es un anticuerpo anti-progastrina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.
5. El procedimiento de las reivindicaciones 3 a 4, en el que dicho anticuerpo monoclonal se selecciona del grupo que consiste en:
 - Un anticuerpo monoclonal mAb3 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente,
 - 20 - Un anticuerpo monoclonal mAb4 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente,
 - 25 - Un anticuerpo monoclonal mAb16 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente, y
 - 30 - Un anticuerpo monoclonal mAb19 que comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR siguientes, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las tres CDR siguientes, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente.
 - 35
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el anticuerpo monoclonal Mab14 está unido a un vehículo insoluble o parcialmente soluble y el segundo anticuerpo está marcado con una fracción detectable.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el nivel de progastrina se determina en la etapa a) con un ensayo ELISA.
- 40 8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica se elige entre: sangre, suero y plasma.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el riesgo de desarrollar cáncer en dicho sujeto se determina comparando la concentración de la etapa a) con un nivel de referencia.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho nivel de referencia es 0 pM.

11. Un kit que comprende al menos el anticuerpo monoclonal Mab14 producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158, para su uso en el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

12. El kit según la reivindicación 11, que comprende:

5 - un primer anticuerpo anti-progastrina, en el que dicho primer anticuerpo anti-progastrina es el anticuerpo monoclonal Mab14 producido por el hibridoma depositado en el CNCM, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX 15, Francia, el 27 de diciembre de 2016, con la referencia I-5158; y

- un segundo anticuerpo anti-progastrina, estando marcado dicho segundo anticuerpo anti-progastrina, en donde dicho segundo anticuerpo anti-progastrina es:

10 • un anticuerpo policlonal que se une al extremo terminal N de la progastrina o

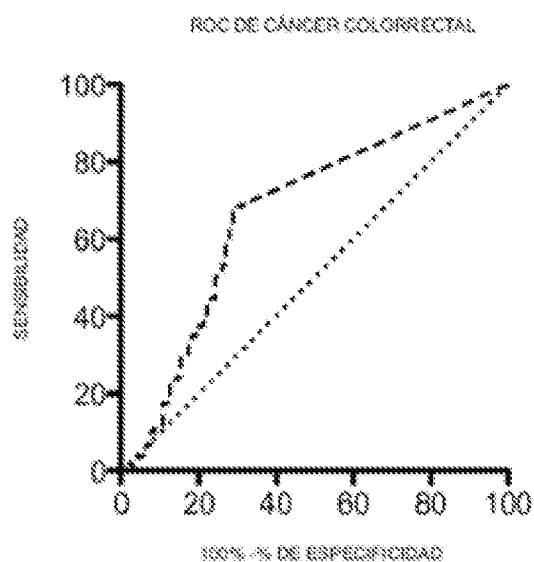
• un anticuerpo monoclonal seleccionado en el grupo que consiste en:

15 - Un anticuerpo monoclonal mAb3 que comprende una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente,

20 - Un anticuerpo monoclonal mAb4 que comprende una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente,

25 - Un anticuerpo monoclonal mAb16 que comprende una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente, y

30 - Un anticuerpo monoclonal mAb19 que comprende una cadena pesada que comprende las siguientes tres CDR, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las siguientes tres CDR, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 25, 26 y 27, respectivamente.

Figura 1

	RESULTADOS
ÁREA	0.6694
ERROR ESTÁNDAR	0.03583
95% DE INTERVALO DE CONFIANZA	0.5992 A 0.7396
VALOR P	< 0.0001
DATOS	
CONTROLES (CONTROL n=103)	103
PACIENTES (CRC n=148)	148

Figura 2

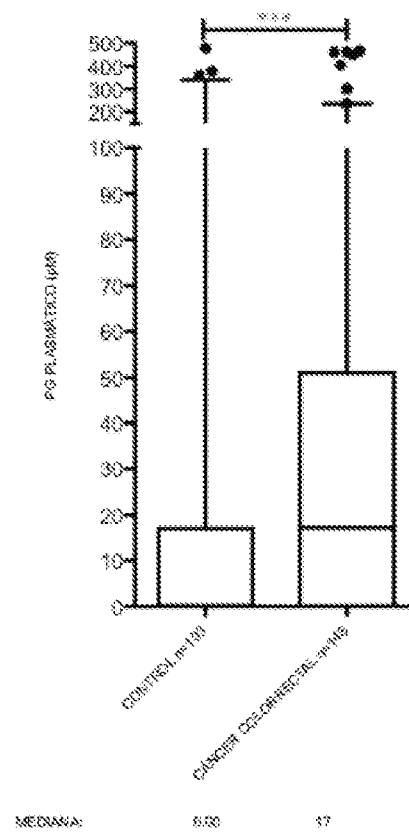
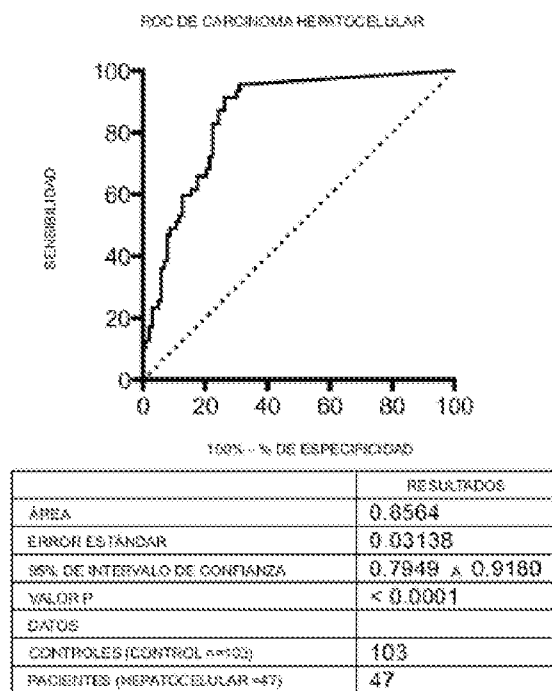


Figura 3



MEDIANA: 0.00 17

Figura 4

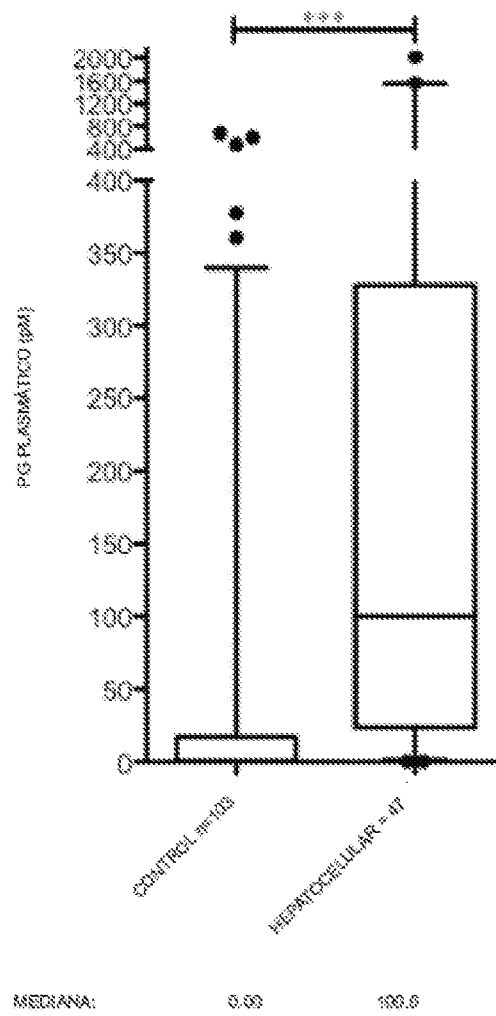
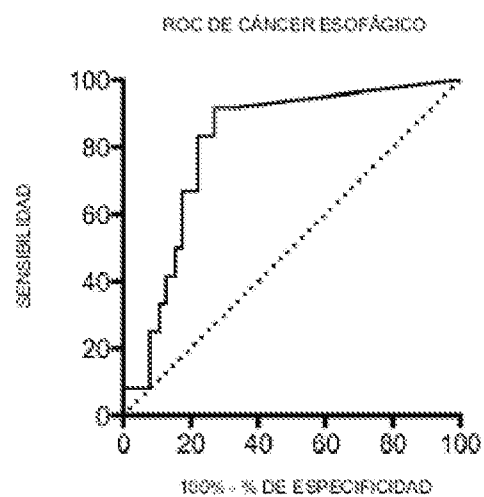


Figura 5

	RESULTADOS
ÁREA BAJO LA CURVA DE ROC	
ÁREA	0.8103
ERROR ESTÁNDAR	0.05653
95% DE INTERVALO DE CONFIANZA	0.6995 A 0.9211
VALOR P	0.0004547
DATOS	
CONTROLES (CONTROL ≈ 103)	103
PACIENTES (CÁNCER ESOFÁGICO ≈ 12)	12

Figura 6

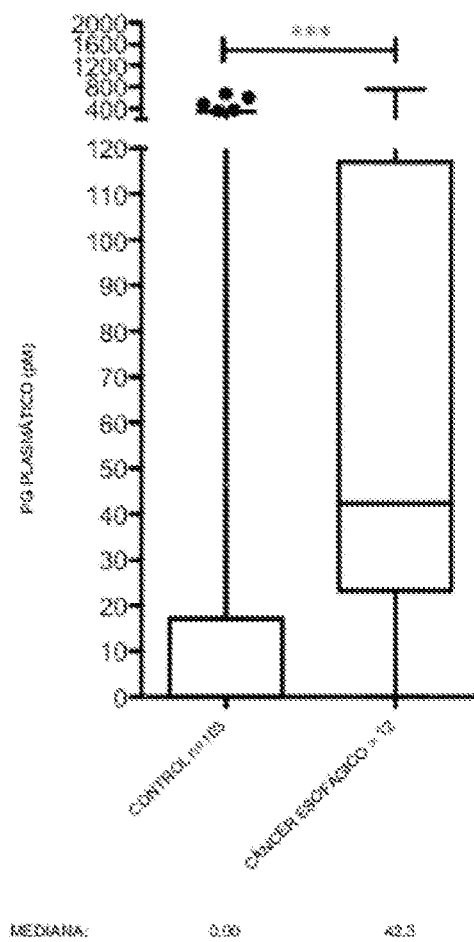


Figura 7

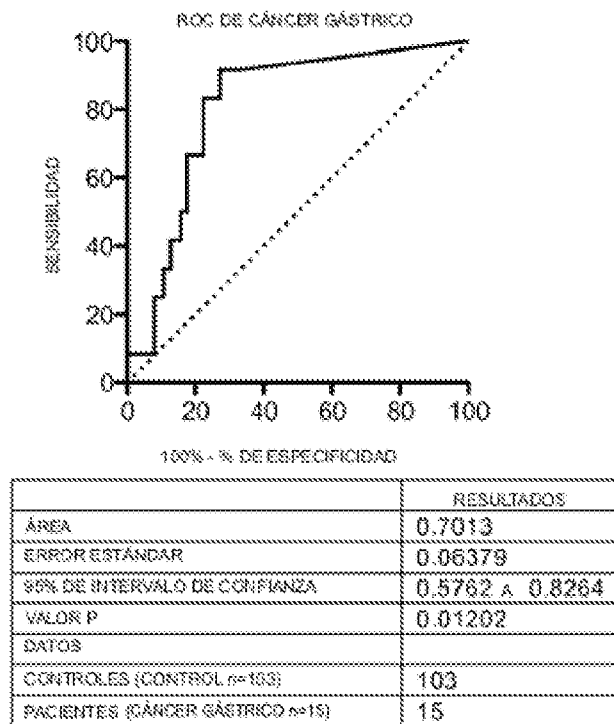


Figura 8

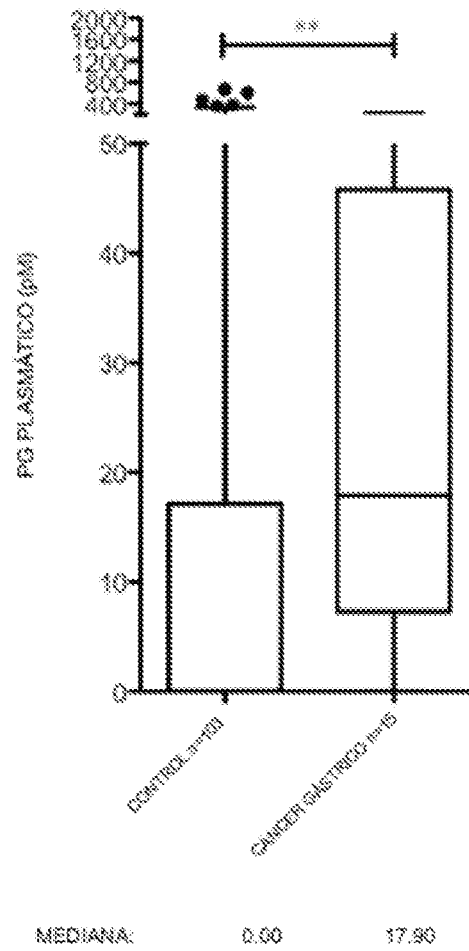
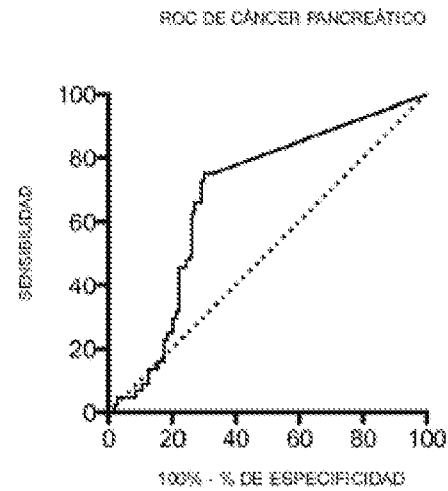


Figura 9

	RESULTADOS
ÁREA	0.6782
ERROR ESTÁNDAR	0.04704
95% DE INTERVALO DE CONFIANZA	0.5660 A 0.7704
VALOR P	0.0006417
DATOS	
CONTROLES (control n=103)	103
PACIENTES (CÁNCER PANCREÁTICO n=44)	44

Figura 10

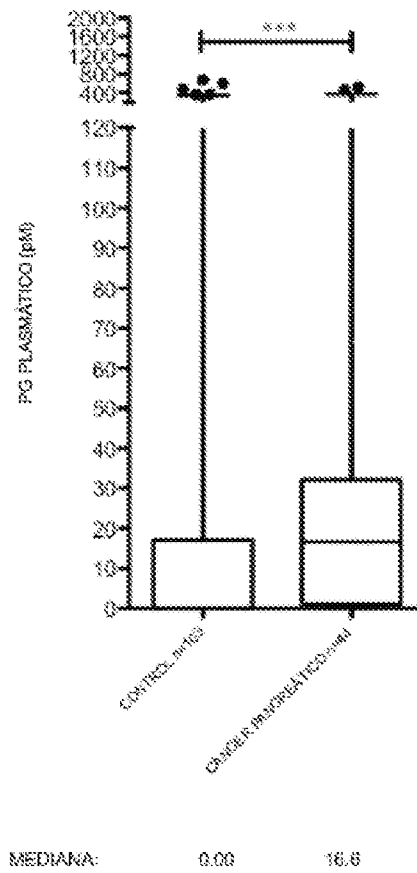
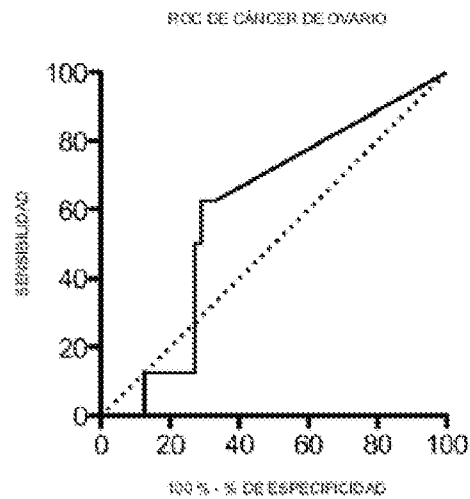


Figura 11

	RESULTADOS
ÁREA BAJO LA CURVA DE ROC	
ÁREA	0.5965
ERROR ESTÁNDAR	0.09156
95% DE INTERVALO DE CONFIANZA	0.4170 A 0.7760
VALOR P	0.3647
DATOS	
CONTROLES (control n=103)	103
OVARIO (PACIENTES n=8)	8

Figura 12

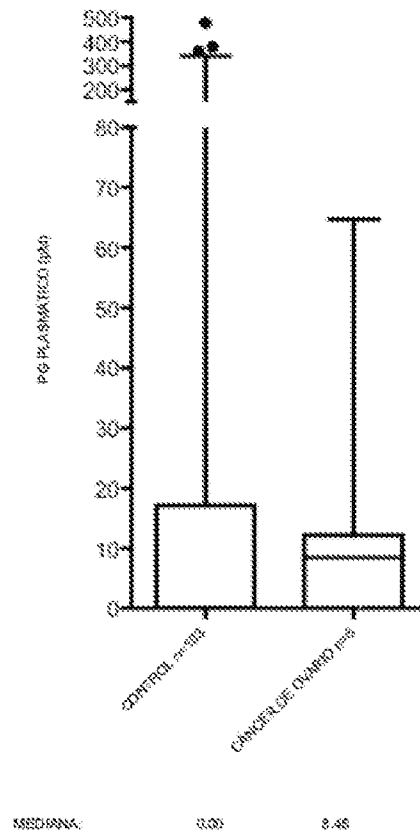


Figura 13

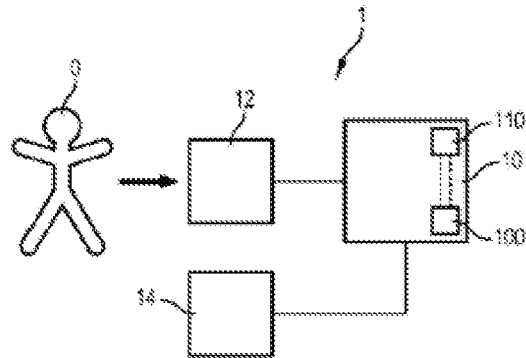
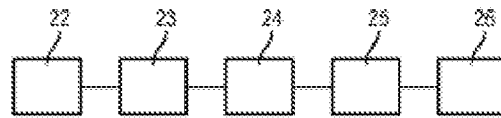
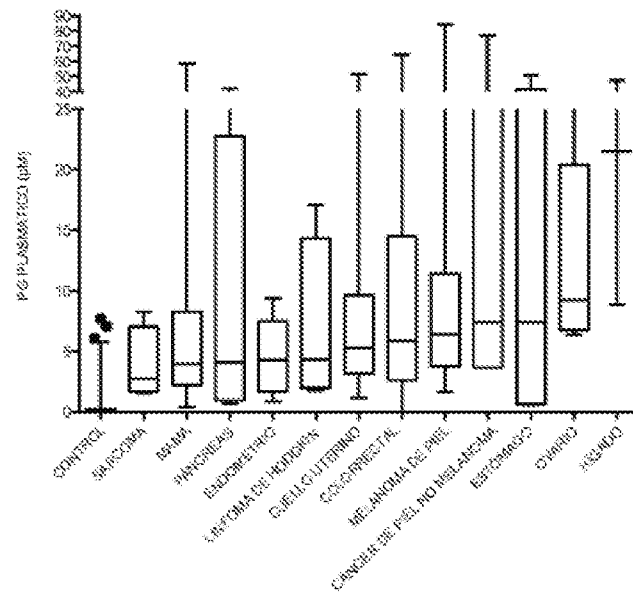


Figura 14





	NÚMERO DE MUESTRAS	MEDIA
CONTROL	522	0.000
SARCOMA	4	2.750
MAMA	85	4.200
PANCREAS	6	4.150
ENDOMETRIO	5	4.300
LINFOMA DE HODGKIN	4	4.350
CUELLO UTERINO	25	5.300
COLORECTAL	52	5.900
MELANOMA DE PIEL	46	6.450
NMSC	9	7.400
ESTOMAGO	4	7.400
OVARIO	8	8.250
HIGADO	3	21.60

Figura 15

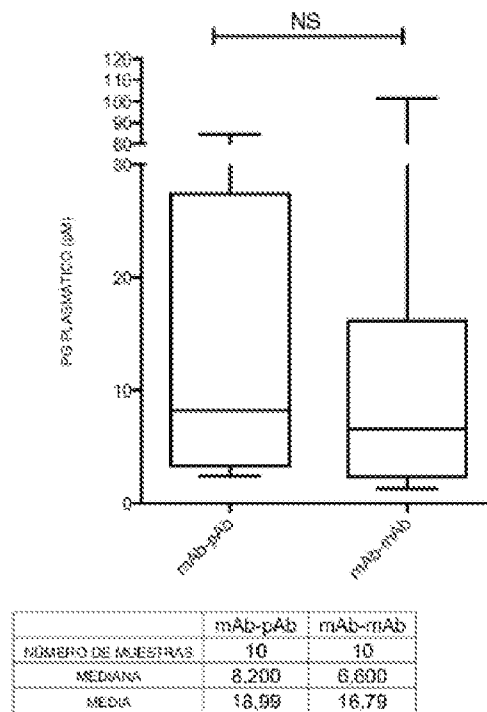


Figura 16