

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 304**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07820692 .7**
96 Fecha de presentación: **28.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2069395**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Antígenos y anticuerpos novedosos asociados a adenocarcinoma ductal pancreático**

30 Prioridad:
29.09.2006 EP 06121552
20.12.2006 EP 06126726

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2012

73 Titular/es:
RIBOVAX BIOTECHNOLOGIES SA
12, AVENUE DES MORGINES
1213 PETIT-LANCY (GENEVA), CH y
BIOLINE DIAGNOSTICI SRL

72 Inventor/es:
NOVELLI, Francesco;
TOMAINO, Barbara y
CAPPELLO, Paola

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 381 304 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

Antígenos y anticuerpos novedosos asociados a adenocarcinoma ductal pancreático

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a medios novedosos para diagnosticar y tratar cánceres humanos, en particular los de origen pancreático.

Antecedentes de la invención

10 El adenocarcinoma ductal pancreático (PDA) es el cáncer pancreático más frecuente y la cuarta causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos y Europa. La mayoría de pacientes mueren en el plazo de 12 meses, y sólo el 2% sobrevive cinco años tras el diagnóstico. La pancreatometría sigue siendo la piedra angular del manejo de PDA y la quimioterapia proporciona sólo un beneficio de supervivencia mínimo (Laheru D y Jaffee M, 2005; Kleef J *et al.*, 2006).

15 A pesar del manejo médico y quirúrgico mejorado (incluyendo el uso de anticuerpos monoclonales, vacunas y quimioterapia), existen todavía pocos marcadores y escasamente fiables para el diagnóstico de PDA temprano. El marcador serológico más ampliamente usado para el diagnóstico de cáncer pancreático es el antígeno del grupo sanguíneo Lewis sialilado CA 19-9, pero su uso se dirige en su mayoría hacia la monitorización de la respuesta a la terapia, en lugar del diagnóstico de PDA. De hecho, este antígeno también puede estar presente en concentraciones elevadas en los sueros de pacientes afectados por enfermedades pancreáticas benignas (tales como pancreatitis crónica u obstrucción biliar) proporcionando falsos positivos, y no puede usarse en todos los casos debido a que no se expresa en absoluto en el 5-10% de la población (Okusaka T *et al.*, 2006).

20 Es por estos motivos que están en evaluación biomarcadores alternativos para su uso en el diagnóstico de PDA, con el objetivo de limitar procedimientos invasivos tales como biopsias y evaluación histopatológica (Bouvet M, 2004; Brand R, 2001; Goggins M, 2005; Leung T *et al.*, 2005), y para evaluar candidatos a fármacos (Cohen S y Meropol N, 2002; Jimcno A e Hidalgo M, 2006).

25 Se han empleado recientemente diversas tecnologías para la identificación de biomarcadores de PDA candidatos usando análisis a gran escala de la expresión de proteínas (basándose en niveles o bien de proteína o bien de ARN). En particular, se han usado tecnologías de proteómica para detectar antígenos que provocan una respuesta humoral en los sueros de pacientes con PDA comparando las proteínas que se resuelven por electroforesis en gel bidimensional (2-DE), reconocidas por anticuerpos séricos de pacientes con cáncer, e identificadas usando espectrometría de masas (Gorg A *et al.*, 2004; Graham D *et al.*, 2005). Se han descrito variantes de este enfoque para la separación, selección y caracterización de proteínas con nombres diferentes en la bibliografía, tal como SERPA (Klade C *et al.*, 2001), PROTEOMEX (Lichtenfels R *et al.*, 2003) o SPEAR (Unwin R *et al.*, 2003).

35 La hipótesis de trabajo común para estas metodologías es que, caracterizando el repertorio de células B frente a antígenos expresados específicamente por cánceres (el denominado inmunoma de cáncer humano), debe ser posible definir dianas específicas que están implicadas en la inmunovigilancia e inmunomodulación del cáncer, y entender los mecanismos que conducen a proliferación celular no controlada y metástasis (Drake C *et al.*, 2006; Dunn G *et al.*, 2004).

40 Se ha sugerido que la inmunoterapia puede ser un enfoque valioso para el tratamiento del cáncer pancreático (Laheru D y Jaffee M, 2005). De hecho, se han generado listas de proteínas específicas de PDA candidatas basándose en su elevada expresión en el nivel de ARN (documento WO 04/55519), o de análisis proteómico a gran escala de muestras de suero y/o muestras pancreáticas (Bhattacharyya S *et al.*, 2004; Cao D *et al.*, 2005; Cecconi D *et al.*, 2003; Chen R *et al.*, 2005; Gronborg M *et al.*, 2006; Honda K *et al.*, 2005; Koomen J *et al.*, 2005; Rodriguez J *et al.*, 2005; Shen J *et al.*, 2004, Rosty C y Goggins M, 2005; Sinha P *et al.*, 1999; Yu Y *et al.*, 2005). Las proteínas candidatas para el diagnóstico de PDA en sueros son fibrinógeno gamma (Bloomston M *et al.*, 2006), proteína 48 DEAD-Box (Xia Q *et al.*, 2005), MIC-1 (Koopmann et J al., 2004), proteína relacionada con PTH (Bouvet M *et al.*, 2001) y calreticulina (Hong S *et al.*, 2004).

Se ha observado la sobreexpresión de alfa-enolasa humana en adenocarcinoma ductal pancreático humano, especulándose sobre la posibilidad de usarla en el diagnóstico y la terapia. Sin embargo, no se ha identificado ninguna isoforma específica de alfa-enolasa (Shen J *et al.*, 2004).

50 Sin embargo, todavía se necesitan biomarcadores fiables para la detección temprana de PDA y su diferenciación de otros cánceres o patologías pancreáticas.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en la observación de que sueros de pacientes con PDA, en comparación con sueros de individuos sanos o de individuos afectados por otras patologías, contienen anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas que se expresan en una línea celular originada a partir de cánceres pancreáticos. La presencia de estas proteínas se confirmó usando anticuerpos purificados específicos para tales proteínas en extractos obtenidos a partir de tejidos pancreáticos normales y con PDA.

Un objeto principal de la presente invención son isoformas asociadas a PDA, novedosas de alfa-enolasa humana (ENOA) según la reivindicación 1.

Un objeto adicional de la invención son anticuerpos que se unen a estas isoformas fosforiladas de ENOA y las distinguen de otras isoformas de ENOA. Los anticuerpos pueden estar en cualquier formato apropiado, tal como anticuerpos monoclonales (en particular anticuerpos monoclonales humanos) y fragmentos de anticuerpo.

Las proteínas que se han definido como asociadas a PDA en la invención y los anticuerpos que se unen a las mismas (así como cualquier otro medio específico para detectarlos) pueden usarse en métodos para el diagnóstico de PDA, así como para identificar agentes para tratar PDA. En particular, la detección basada en anticuerpos de las isoformas fosforiladas de ENOA asociadas a PDA en muestras biológicas (tales como sueros o biopsias) obtenidas a partir de un paciente pueden usarse en métodos para el diagnóstico de PDA, para evaluar la evolución de la enfermedad o para evaluar los efectos de fármacos para tratar PDA.

Objetos adicionales de la presente invención son kits para el diagnóstico de PDA según la reivindicación 6.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del método SERPA aplicado para caracterizar anticuerpos y antígenos de proteína asociados a PDA usando células CF-PAC-1 (células tumorales) y sueros a partir de pacientes con PDA (tumores) o donantes (sanos) control.

Figura 2: (A) Gel 2-DE preparado usando un extracto de proteína a partir de la línea celular CF-PAC-1 como ensayo para detectar la expresión de proteína asociada a PDA. Las proteínas en el extracto celular se separaron en el gel según su peso molecular y pI y se revelaron usando tinción con plata. Se indica la posición de puntos presentes en la inmunotransferencia de tipo Western con sueros de PDA, y no con sueros control (el nombre de la proteína específica correspondiente a cada número se enumera en la tabla I). (B) Histogramas que representan el porcentaje de sueros de pacientes (el número de ellos en cada grupo se indica como n) que están afectados por pancreatitis crónica (CP) o por PDA en diferentes estadios (II, III, IV) que contienen anticuerpos que reconocen las proteínas asociadas a PDA indicadas. El nombre completo de las proteínas correspondiente a los acrónimos se indica en la tabla I.

Figura 3: Alineación de las secuencias de proteína de alfa-enolasa humana (ENOA; n.º reg. de SWISSPROT P06733; SEQ ID NO: 1) y gamma-enolasa humana (ENOG n.º reg. de SWISSPROT P09104; SEQ ID NO: 2) (los aminoácidos que son idénticos en las dos proteínas se indican con “.”, mientras que los sólo conservados se indican con “-”). Las secuencias de los péptidos que se han identificado mediante espectrometría de masas en los puntos del gel 2-DE y usado para asignar isoformas de ENOA a tales puntos están subrayadas.

Figura 4: Posición de los sitios de fosforilación (negrita, subrayado) en la secuencia de proteína de alfa-enolasa humana (ENOA) que se pronostican mediante diferentes algoritmos y/o se identifican experimentalmente (letras en minúscula debajo de la secuencia de proteína; véase la leyenda para referencias). Los péptidos que se identifica en ENOA que están fosforilados en la isoforma 3 de ENOA están recuadrados con una línea normal. Los péptidos que se identifica que no están fosforilados en la isoforma 3 de ENOA están recuadrados con una línea discontinua.

Figura 5: (A) Detección de seis isoformas de alfa-enolasa (ENOA 1, 2, 3, 4, 5, 6) mediante diferentes medios. La posición de ENOA 1/2, y 3 se indica con las flechas blancas. (B) Detección de las seis isoformas de alfa-enolasa (1, 2, 3, 4, 5, 6) en extractos de proteína de un tejido pancreático normal o de un tejido pancreático de un paciente con PDA, que se ha transferido sobre una membrana y luego se ha sometido a prueba mediante inmunotransferencia de tipo Western, usando anti-ENOA como anticuerpo primario. Las posiciones de las isoformas 1/2 de ENOA se indican con las flechas blancas. Como control de la cantidad de proteína cargada en el gel y transferida sobre la membrana, se estudió con sonda la membrana con anticuerpo policlonal de conejo anti-actina humana (dilución 1:10000; Sigma Chemical Co.).

Figura 6: Detección de las seis isoformas de alfa-enolasa (punto 1, 2, 3, 4, 5, 6) en extractos de células CF-PAC-1 mediante geles 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western, usando (como anticuerpo primario) un conjunto de sueros de pacientes con PDA con o sin preadsorción con alfa-enolasa humana recombinante (+rENOA o -rENOA).

Alternativamente, se trató previamente la membrana con una fosfatasa (+λPPASE) antes de realizar la inmunotransferencia de tipo Western, usando (como anticuerpo primario) un conjunto de sueros de pacientes con PDA.

Descripción detallada de la invención

5 El uso combinado de tecnologías de proteómica y bioquímicas puede permitir la identificación y la evaluación de proteínas individuales presentes en muestras biológicas relacionadas con la enfermedad. En el presente caso, este tipo de análisis se dirigió inicialmente a un cáncer (PDA) e hizo uso de dos fuentes de moléculas asociadas a la enfermedad: una línea celular (CF-PAC-1) derivada de adenocarcinoma ductal pancreático humano (PDA) y sueros obtenidos a partir de un panel grande de pacientes con PDA, que contienen potencialmente anticuerpos asociados a la oncogénesis y/o evolución de PDA.

El perfil de proteínas inmunorreactivas detectadas en los extractos de CF-PAC-1 mediante el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de estos sueros se comparó con el obtenido usando sueros de diferentes poblaciones control (sujetos sanos, pacientes con tumores no PDA, pacientes con pancreatitis crónica) con el fin de establecer anticuerpos asociados a PDA candidatos y antígenos relacionados en el proteoma de CF-PAC-1 (fig. 1).

15 Se encontró que estaban presentes selectivamente anticuerpos frente a un número restringido de proteínas, que tenían distintas actividades biológicas conocidas (incluyendo enzimas metabólicas y proteínas del citoesqueleto), en sueros de pacientes con PDA, lo que sugiere que estas proteínas están asociadas a PDA e inducen una respuesta de anticuerpos *in vivo* en pacientes con PDA, y no en sujetos sanos o en pacientes con cáncer no PDA.

20 Las proteínas y los anticuerpos que se han definido como asociados a PDA en la invención (y cualquier otro medio específico para detectarlos), pueden usarse en métodos para el diagnóstico de PDA, así como para identificar agentes para tratar PDA.

25 Se ha definido el panel de proteínas humanas asociadas a PDA (que comprende alfa-enolasa, trifosfato isomerasa, deshidrogenasa-1 retiniana, glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa, factor de elongación Tu e isocitrato deshidrogenasa, queratina tipo I del citoesqueleto 10, cofilina 1; fig. 2B y tabla I), usando las tecnologías de 2-DE y espectrometría de masas para el análisis y la separación de proteínas, así como los antígenos para anticuerpos específicamente presentes en los sueros de PDA. Además, anticuerpos purificados contra estos antígenos confirmaron su expresión diferencial, y por tanto la utilidad de cualquier medio a base de proteínas para detectarlos (incluyendo sueros, anticuerpos completa o parcialmente purificados, preparaciones de anticuerpos policlonales y péptidos) para el diagnóstico temprano de PDA y para evaluar la evolución de este cáncer en pacientes.

30 Estas proteínas pueden usarse, cada una por separado o en combinación, como biomarcadores para el diagnóstico temprano de PDA y para evaluar la evolución de este cáncer en pacientes. Entre estos biomarcadores, ENOA 1/2 (isoforma 1 e isoforma 2 de alfa-enolasa) y COF1 (cofilina 1), tal como se identificaron por medio de 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western, parecen ser los antígenos proteicos asociados a PDA de la manera más fiable.

35 Tal como se muestra en los ejemplos, pueden usarse anticuerpos que se unen a tales antígenos asociados a PDA para los alcances enumerados anteriormente. Por tanto, métodos que comprenden la detección de tales antígenos y/o anticuerpos en una muestra biológica (tales como sueros, biopsias, o extractos de proteínas celulares/tisulares) permiten el diagnóstico temprano de PDA y la evaluación de la evolución del PDA en pacientes.

40 La caracterización de los antígenos asociados a PDA, excepto en un caso descrito a continuación, no se extendió a la definición de cualquier modificación postraducciona en las proteínas asociadas a PDA. Los datos sugieren que cualquier anticuerpo o péptido que une específicamente o bien a un epítipo común a todas las isoformas de un antígeno dado (como los anticuerpos purificados usados para la tabla I, columna derecha) o bien sólo a la(s) isoforma(s) que contiene(n) la modificación postraducciona asociada a PDA (como las presentes en los sueros de pacientes con PDA y medidas durante la evolución del PDA; véase la fig. 2B), pueden usarse para establecer un diagnóstico y evolución de PDA.

45 Dado el interés de proporcionar compuestos terapéuticos novedosos para tratar PDA, los métodos que comprenden la detección de anticuerpos y antígenos asociados a PDA (así como de sus propiedades de unión) en muestras biológicas también pueden usarse para evaluar fármacos candidatos para tratar PDA. Este enfoque puede aplicarse en ensayos en los que puede compararse la presencia de anticuerpos y/o proteínas asociados a PDA, tal como se muestra en los ejemplos con isoformas de ENOA (ENOA 1/2).

50 Cambios en estas propiedades, que pueden establecerse usando las tecnologías de proteómica y bioquímicas descritas en los ejemplos y en la bibliografía, y que siguen a la exposición a un compuesto candidato, puede ser indicativos de la ruta biológica que conduce a oncogénesis y metástasis de PDA. Por ejemplo, es posible verificar la actividad específica de PDA de un compuesto detectando la desaparición de anticuerpos primarios contra los

antígenos asociados a PDA en sueros de pacientes o modelos animales, así como la reducción en el número de puntos mediante inmunotransferencia de tipo Western en extractos celulares usando anticuerpos específicos de antígeno.

5 Los compuestos candidatos pueden dirigirse a cualquier diana terapéutica de PDA posible, incluyendo las definidas en la invención como proteínas asociadas a PDA (tales como COF1 o ENOA 1/2). Por ejemplo, los compuestos pueden estar en forma de anticuerpos que se unen a las mismas (en general o sólo isoformas específicas), o de moléculas pequeñas que alteran su expresión o modificación postraduccional modulando la actividad de enzimas que las modifican. Además, se encontró que anticuerpos que unen alfa-enolasa humana, tal como un anticuerpo monoclonal murino, inhiben la proliferación y el crecimiento *in vitro* de líneas celulares transformadas de origen pancreático que presentan seis isoformas de alfa-enolasa (es decir, incluyendo ENOA 1/2, tal como se detectó usando los sueros de pacientes con PDA en inmunotransferencia de tipo Western). Este efecto inhibitorio sobre la proliferación y el crecimiento *in vitro* se observó también para una línea celular transformada de origen no pancreático que presenta tales seis isoformas de alfa-enolasa, pero no sobre una que presenta sólo tres isoformas no fosforiladas (ejemplo 3; fig. 5B; tabla IV), lo que sugiere la posibilidad de usar anticuerpos anti-ENOA para el tratamiento de PDA.

Entonces, tales posibles propiedades terapéuticas pueden evaluarse en cualquiera de los ensayos de proliferación para células pancreáticas haciendo uso de líneas celulares o modelos animales y ya sometidos a prueba para verificar el efecto de diferentes compuestos, tales como péptidos, análogos de péptidos y moléculas pequeñas que afectan a la transducción de señales (Baker C *et al.*, 2002; Bauer T *et al.*, 2005; Bruns C *et al.*, 2000; Lee L *et al.*, 2002; Levitzki A y Mishani E, 2006; Qin Y *et al.*, 1995; Yezhelyev M *et al.*, 2004; Rubio-Viqueira B *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado la posibilidad de usar combinaciones de compuestos que seleccionan como diana diferentes dianas moleculares para tratar cánceres pancreáticos más eficazmente. Por ejemplo, la administración de un reactivo quimioterápico junto con inhibidores de cinasas específicos para receptores de la membrana celular proporcionaron la inhibición del crecimiento de cáncer pancreático humano experimental y prolongación significativa de la supervivencia en un modelo animal (Yokoi N *et al.*, 2005). Alternativamente, se ha descrito que, cuando dos o más anticuerpos dirigidos a una diana humana o viral se combinan en una composición farmacéutica, la composición resultante puede mostrar una eficacia de diagnóstico y/o terapéutica mejorada debido no sólo a un efecto aditivo sino también a un efecto sinérgico. (Logtenberg T, 2007).

Una composición farmacéutica que comprende anticuerpos contra las proteínas asociadas a PDA (tales como ENOA 1/2) puede administrarse para fines de diagnóstico o terapéuticos en seres humanos. Por tanto, los métodos para el tratamiento o el diagnóstico de PDA pueden comprender la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos contra las proteínas asociadas a PDA (tales como ENOA 1/2).

Las composiciones pueden incluir excipientes farmacéuticos comunes y pueden administrarse en dosificaciones individuales o múltiples y/o usando dispositivos apropiados, a través de diferentes vías: por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía mucosa, en materiales de matriz biodegradables/no biodegradables, o usando sistemas de administración de fármacos particulados. En particular, la composición debe permitir la administración eficaz al páncreas, o a cualquier otro tejido en el que las proteínas asociadas a PDA puedan estar presentes.

Una composición farmacéutica debe proporcionar una cantidad terapéutica o proliferativamente eficaz del compuesto al sujeto que permita que el compuesto ejerza su actividad durante un periodo de tiempo suficiente. El efecto deseado es mejorar el estado del paciente con PDA controlando la proliferación y el crecimiento del PDA, y reduciendo al menos algunas de las manifestaciones clínicas del PDA. Por ejemplo, la composición debe administrarse a una cantidad eficaz de desde aproximadamente 0,005 hasta aproximadamente 50 mg/kg/peso corporal, dependiendo de la vía de administración y el estado del individuo.

En el caso de composiciones que tienen usos de diagnóstico, el compuesto debe detectarse usando tecnologías comúnmente establecidas en los laboratorios de investigación y clínicos para la detección de virus en muestras biológicas (por ejemplo ELISA u otros ensayos serológicos) o, cuando se administran a un sujeto *in vivo*, al menos 1, 2, 5, 10, 24 o más horas tras la administración. La detección de anticuerpos y/o proteínas asociados a PDA puede realizarse, usando los anticuerpos y/o las proteínas asociados a PDA de la invención, tras o en combinación con los medios y procedimientos conocidos que se han establecido para el diagnóstico de PDA.

El uso y desarrollo clínico para la terapia y/o el diagnóstico de PDA debe basarse en la caracterización de la farmacodinámica y farmacocinética del anticuerpo (Lobo E *et al.*, 2004), los datos de seguridad preclínica y clínica (Tabrizi M y Riskos L, 2007) y el cumplimiento con requisitos internacionales para la producción y el control de calidad de anticuerpos monoclonales para uso de diagnóstico *in vivo* y terapéutico en seres humanos (Harris R *et al.* 2004).

Los kits para el diagnóstico de PDA en un paciente pueden comprender uno o más de los anticuerpos y/o proteínas asociados a PDA definidos anteriormente, y cualquier otro compuesto que permita su detección, tal como se definen

en la presente invención. Estos kits pueden comprender sustratos, anticuerpos o antígenos marcados/no marcados que se modifican tras la interacción con tal antígeno (por ejemplo, en el caso de los que se identifica que tienen actividades enzimáticas).

Entre las dianas de la respuesta humoral a PDA, es de particular interés el hallazgo de que isoformas fosforiladas, novedosas de alfa-enolasa se reconocen por sueros de PDA. Las isoformas novedosas de alfa-enolasa humana (ENOA) están fosforiladas en al menos tres posiciones, y se han identificado un total de siete sitios de fosforilación (figura 4). La importancia de este hallazgo se corrobora por la detección específica de dos isoformas de ENOA altamente fosforiladas (ENOA 1/2) usando sueros obtenidos a partir de pacientes con PDA o en tejidos pancreáticos obtenidos a partir de pacientes con PDA (figura 2B, 5 y 6; tabla I y II). Los pacientes con PDA presentan anticuerpos que se unen específicamente a las isoformas de ENOA altamente fosforiladas de la invención.

Los ejemplos muestran que, a pesar de que varias posiciones en la secuencia de ENOA pueden estar fosforiladas, una combinación precisa de residuos de Treonina, Serina y Tirosina están en realidad fosforilados, tanto en tejidos con PDA como en líneas celulares, y se detectan mediante anticuerpos humanos producidos por pacientes con PDA. En particular, está presente fosforilación en Treonina 55, Tirosina 57, Tirosina 200, Tirosina 236, Treonina 237, Tirosina 257 y Serina 419 en la isoforma 3 de ENOA que muestra, como ENOA 1/2, un perfil de fosforilación de proteínas que se altera mediante los tratamientos con fosfatasa. Pueden usarse cambios similares en la fosforilación de proteínas para diagnosticar PDA y para evaluar la evolución de la enfermedad usando muestras biológicas obtenidas de un paciente.

En alternativa a las isoformas de ENOA 1/2 completas, puede ser útil generar péptidos individuales derivados de ENOA, secuencias de proteínas que las comprenden, o bibliotecas y combinaciones de las mismas, que presentan los mismos residuos fosforilados de ENOA 1/2, tales como los identificados en la figura 4 (véanse las secuencias recuadradas). Métodos para generar y usar tales péptidos y proteínas fosforiladas se dan a conocer en la bibliografía (Conrads T *et al.*, 2002; documento US5763164; documento WO 97/30097).

El número y el efecto de las modificaciones postraduccionales en las isoformas de alfa-enolasa (en particular ENOA 1/2) pueden confirmarse adicionalmente mediante tecnologías conocidas (Kalume D *et al.*, 2003; Machida K *et al.*, 2003; Mann M *et al.*, 2002; Rush J *et al.*, 2005; Molina H *et al.*, 2007; Schmelzle K y White F, 2006; Wu J *et al.*, 2005) en muestras control y asociadas a PDA. Pueden estar presentes modificaciones y/o fosforilaciones adicionales conocidas para ENOA (tabla III) en ENOA 1/2 y ser relevantes para la antigenicidad y la actividad biológica de estas isoformas, así como para su detección mediante anticuerpos específicos de isoforma. Puede detectarse la modificación postraduccional asociada a tipos/estadios específicos de la enfermedad mediante varios medios incluyendo análisis de proteínas directo o anticuerpos que distinguen isoformas que tienen modificaciones específicas, tal como se muestra para otras proteínas (Edbcrg D *et al.*, 2005; Mandell J, 2003).

Los anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, que se definen mediante su unión a las isoformas de proteína expresadas diferencialmente en extractos de proteínas de PDA/no PDA mediante 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western pueden usarse en el tratamiento de cánceres que tienen un perfil similar en 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western. Por tanto, los anticuerpos que se unen a alfa-enolasa (en general, o las isoformas fosforiladas específicas en particular) pueden usarse en la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de PDA y en métodos para el tratamiento terapéutico de pacientes con PDA, o de pacientes con cáncer que presentan un perfil de expresión similar para alfa-enolasa (es decir, que expresan las isoformas novedosas de alfa-enolasa humana de la invención que están fosforiladas en al menos 3 posiciones).

Pueden usarse anticuerpos para la detección o el tratamiento de cánceres (tales como PDA) que se caracterizan por la presencia en el suero de los pacientes de isoformas fosforiladas de alfa-enolasa. Estos anticuerpos pueden generarse aplicando cualquiera de las tecnologías conocidas para identificar, caracterizar y producir anticuerpos de interés terapéutico o de diagnóstico (Jain M *et al.*, 2007; Laffly E y Sodoyer R, 2005). El anticuerpo puede generarse en cualquier formato de proteína para anticuerpos funcionales, como anticuerpos completos (tales como anticuerpos monoclonales, en particular un anticuerpo monoclonal humano o humanizado), fragmentos de anticuerpo, proteínas de unión a antígenos, y otras proteínas y péptidos de fusión a base de anticuerpos producidos por ingeniería genética, que se describen en la literatura con diferentes nombres tales como Scfv (fragmento variable de cadena sencilla), Fab (heterodímero de cadena pesada/ligera variable), diacuerpo, cadenas pesadas o ligeras aisladas, peptacuerpos o anticuerpos biespecíficos.

Los anticuerpos de la invención pueden mejorarse con la conjugación (usando polímeros o ligadores químicos) o la fusión a agentes terapéuticos, estabilizadores, de marcaje o de diagnóstico. Ejemplos de estos agentes son moléculas de marcador detectable (por ejemplo un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una toxina, un átomo de metal, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto bioluminiscente, biotina, un sustrato enzimático, o una enzima) que pueden unirse. La actividad específica de ENOA también puede mejorarse mediante la fusión con otra proteína terapéutica, tal como una proteína o un polímero que altera el metabolismo y/o la estabilidad en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico.

- Se proporcionan en la bibliografía medios para escoger y diseñar restos, ligandos y ligadores de proteínas apropiados, así como métodos y estrategias para la construcción, purificación, detección y uso de proteínas de fusión (Nilsson *et al.*, 1997; "Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins" *Methods Enzymol.* Vol. 326-328, Academic Press, 2000; documento WO 01/77137) y están disponibles comúnmente en laboratorios de investigación y clínicos. Por ejemplo, la proteína de fusión puede contener secuencias reconocidas por anticuerpos comerciales (incluyendo etiquetas tales como etiquetas de polihistidina, FLAG, c-Myc o HA) que pueden facilitar la identificación *in vivo* y/o *in vitro* de la proteína de fusión, o su purificación. Otras secuencias de proteína pueden identificarse fácilmente mediante análisis de fluorescencia directa (como en el caso de la proteína fluorescente verde), o mediante enzimas o sustratos específicos (usando sitios proteolíticos, por ejemplo).
- Los anticuerpos que reconocen las secuencias de proteína específicas de PDA (tal como ENOA 1/2), o cualquier otra secuencia de proteína derivada de tal anticuerpo, pueden expresarse como una proteína recombinante usando tales vectores para transformar las células huésped apropiadas que pueden ser células huésped procariontas o eucariotas y deben permitir la secreción de la proteína recombinante deseada. Los métodos para producir tales proteínas incluyen el cultivo de células huésped transformadas con los vectores de expresión que comprenden sus secuencias codificantes en condiciones adecuadas para la expresión de proteína y la recuperación de la proteína del cultivo de la célula huésped.
- Los vectores para la expresión en células huésped procariontas o eucariotas se describen en libros y revisiones sobre cómo clonar y producir proteínas recombinantes, incluyendo títulos en la serie "A Practical Approach" publicado por Oxford Univ. Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001). Pueden añadirse secuencias de proteína adicionales en relación con el formato de anticuerpo deseado (Scfv, FAb, fragmento de anticuerpo, anticuerpo completamente humano, etc.), o la inserción, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos internos. Estas tecnologías también pueden usarse para la caracterización y optimización funcional y estructural adicionales de las propiedades terapéuticas de proteínas en general, y de anticuerpos en particular (Kim S *et al.*, 2005).
- La invención se describirá ahora por medio de los siguientes ejemplos, que no debe interpretarse de ningún modo que limitan la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de antígenos humorales asociados a PDA en el proteoma de la línea celular CP-PAC-1

Materiales y métodos

30 *Sueros humanos*

Se aislaron muestras de sueros a partir de sangre venosa con el consentimiento informado de pacientes y donantes sanos y la aprobación de los comités éticos de las instituciones clínicas. Se almacenaron las muestras a -80°C hasta su uso.

- 35 Se obtuvieron los sueros de 70 pacientes con PDA (31 hombres, 39 mujeres; intervalo de 32-86 años; media de edad \pm desviación estándar: 67 ± 11) y se agruparon en diferentes estadios clínicos según la clasificación comúnmente usada (Faria S *et al.*, 2004) y la clasificación de la UICC (Union International Contre le Cancer) tal como sigue: 17 en el estadio II (sin metástasis, moderadamente diferenciado), 17 en el estadio III (sin metástasis, poco diferenciado), y 36 en el estadio IV (metástasis distante, no diferenciado).

- 40 Se comparó la reactividad de estos sueros con la de 40 sujetos sanos que se usaron como controles sin una historia previa de cáncer o enfermedad autoinmunitaria (14 hombres, 26 mujeres; intervalo de 57-77 años; media de edad \pm desviación estándar: 70 ± 7). Además, se comparó la reactividad de estos sueros con la de 30 pacientes con cáncer no PDA (9 pacientes con carcinoma hepatocelular, 12 con cáncer de mama, 8 con cáncer de colon y 1 con cáncer de ovario; 11 hombres, 19 mujeres; intervalo de 44-79 años; media de edad \pm desviación estándar 66 ± 10) y 15 pacientes con pancreatitis crónica (9 hombres, 6 mujeres, intervalo de 49-76 años; media de edad \pm desviación estándar: 59 ± 8).

- 50 La distribución de sexo y edad entre los diferentes grupos de pacientes que proporcionan los sueros no mostró diferencias estadísticamente significativas tal como se evaluó mediante la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes. Sólo en el grupo de pancreatitis crónica, la distribución de la edad (pero no la del sexo) de estos dos grupos era significativamente diferente, puesto que esta enfermedad generalmente se produce a una edad más temprana (alrededor de 44 años, en promedio) que PDA.

Líneas celulares y preparación de extractos celulares.

Se recogieron células (10^7) a partir de la línea celular CF-PAC-1 (n.º ref. de ECACC 91112501), derivadas de un adenocarcinoma ductal pancreático (Schoumacher R *et al.*, 1990) y se lavaron con solución salina equilibrada de Hank (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU). Se secaron por congelación durante la noche los sedimentos y se almacenaron a -80°C . Se resuspendieron los sedimentos en 200 μl de tampón de rehidratación [urea 5 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% p/v (Sigma Chemical Co.), tampón IPG 3-10 NL al 2% v/v (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia), DTT 80 mM (Sigma Chemical Co.)] y trazas de azul de bromofenol (Sigma Chemical Co.). Se midió la concentración de proteína con el ensayo Bradford (laboratorios Bio-Rad).

Electroforesis en gel bidimensional (2-DE)

Se cargaron cien μg de extracto de proteína de la línea celular CF-PAC-1 mediante rehidratación *in gel* sobre tiras IPG de 7 cm, (pH 3-10 NL), para geles preparativos y analíticos. Se realizó el isoelectroenfoque (IEF) sobre un sistema de unidad IPGphor IEF (GE Healthcare Bio-Sciences) con gradiente de voltaje hasta 5000 V para un total de 16000 Vh. Antes de la SDS-PAGE, se equilibraron las tiras IPG durante 15 minutos con una disolución de tampón Tris/HCl (50mM; pH 8,8), urea (6 M), glicerol (30% v/v), SDS (2% p/v) y DTT (2% p/v), y entonces durante 5 minutos adicionales en el mismo tampón que contenía yodoacetamida (2,5% p/v) y azul de bromofenol en lugar de DTT. Para la segunda dimensión, se procesaron tiras de 7 cm sobre geles preformados NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Zoom® (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) pequeños usando el sistema Novex XCell II™ Mini-cell (Invitrogen) a 200 V constantes y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare Bio-Sciences) usando el módulo de transferencia Novex X-Cell II™ (Invitrogen) o se tñieron con plata para el análisis de espectrometría de masas (Shevchenko A *et al.*, 1996).

Se estimaron los valores de *pI* de los puntos de proteína a partir de su posición en el gel 2-DE con gráficos de gradiente de pH proporcionados por GE Healthcare Bio-Sciences. Se calculó el peso molecular de las proteínas mediante comparación con la migración de patrones preteñidos SeeBlue Plus2 (Invitrogen) de peso molecular conocido. Se adquirieron las imágenes del gel 2-DE con "ImageScanner" (GE Healthcare Bio-Sciences) y se grabaron en formato TIFF con el software "ImageMaster Labscan ver. 3.00" (GE Healthcare Bio-Sciences).

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se incubaron las membranas durante 15 horas a 4°C con un tampón de bloqueo que consistía en TBS que contiene leche en polvo desnatada al 5% y luego se incubaron 4 horas con suero (dilución de trabajo 1:200 en TBS que contiene Tween 20 al 0,05% y leche en polvo desnatada al 5%). Tras el lavado, se incubaron las membranas con anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina G humana (IgG) conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:1000 durante 90 minutos a temperatura ambiente.

Alternativamente, para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos primarios purificados, se estudiaron con sonda las membranas de nitrocelulosa inmunotransferidas a partir de geles 2-DE con una dilución 1:1000 de anticuerpos o bien de origen de ratón [tal como los anticuerpos monoclonales anti-enolasa 19/12⁸ (un subclon del clon 19/12 caracterizado en Moscato S *et al.*, 2000), anti-triosafosfatisomerasa 1 (Abnova Corporation), anti-queratina 10 (Chemicon International), anti- factor de elongación tu (Abnova Corporation)] o bien de origen de conejo [tal como los anticuerpos policlonales anti-aldehído deshidrogenasa 1 (Chemicon International), anti-glucosa-6-fosfato-l-deshidrogenasa (Bethyl laboratories), anti-isocitrato deshidrogenasa (Biogenesis Ltd) y anti-cofilina 1 (Cell Signaling)], durante 1 hora a 25°C . Entonces, se incubaron las membranas durante 1 hora con el anticuerpo de cabra secundario específico conjugado con HRP, o bien anti-IgG de ratón o bien anti-IgG de conejo (Santa Cruz Biotechnology), según las instrucciones del fabricante.

Se realizó el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de tejidos pancreáticos usando un total de 30-50 mg de tejido recién congelado que se homogenizó (T18 basic UltraTurrax) sobre hielo en 400 μl de tampón de lisis que contenía TRIS/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 al 1%, Triton X-100 al 1%, DTT 1 mM, cócteles inhibidores 10 $\mu\text{l/ml}$, PMSF 1 mM (todos de Sigma Chemical Co.) y mezcla de nucleasas 10 $\mu\text{l/ml}$ (GE Healthcare Bio-Sciences). Tras la sonicación con un sonicador de ultrasonidos (Hielscher UP200S, 3 \times 40 segundos, amplitud 40%, ciclo 0,5), se centrifugó la mezcla (13000 rpm/min. a 4°C durante 30 minutos). Se procesaron veinte μg de extracto de proteína, contenido en el sobrenadante y medido con el ensayo Bradford (Bio-Rad Laboratories), sobre un gel preformado NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) pequeño, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa tal como se describió anteriormente.

Se realizó la inmunodetección mediante ECL (quimioluminiscencia potenciada, GE Healthcare Bio-Sciences) y se siguió mediante autorradiografía sobre película Hyperfilm (GE Healthcare Bio-Sciences). Se adquirieron las imágenes de películas reveladas con "ImageScanner" (GE Healthcare Bio-Sciences), se grabaron en formato TIFF con el software "ImageMaster Labscan ver. 3.00" (GE Healthcare Bio-Sciences) y se analizaron usando el software Image Master 2D Elite versión 3.1 (GE Healthcare Bio-Sciences).

Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (EM)

Para el análisis de EM, se cortaron los puntos de interés de los geles 2-DE preparativos y se analizaron mediante ionización por desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI-TOF) y, cuando sea necesario, mediante ionización por electrospray (ESI).

- 5 Se destiñeron las proteínas durante la noche con una disolución de bicarbonato de amonio 25 mM y acetonitrilo al 50% y luego se digirieron *in gel* con tripsina (Promega, Madison, WI, EEUU) tal como se describió anteriormente (Hellman U *et al.*, 1995). Para EM por MALDI-TOF, se aplicaron 0,5 µl de cada mezcla de péptidos a un disco diana y se dejó secar al aire. Posteriormente, se aplicaron 0,5 µl de disolución de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico al 1% p/v en acetonitrilo al 30%, TFA al 0,1%) a la muestra seca y de nuevo se dejó secar. Se obtuvieron los espectros usando un espectrómetro de MALDI-TOF Bruker Reflex III. Se hizo la interpretación de los espectros de EM de digestos de proteínas mediante la "obtención de la huella peptídica" ("*peptide mass fingerprinting*") (PMF) usando el software MS-Fit (<http://prospector.uc.sf.edu>; Chamrad D *et al.*, 2004).

- 10 Para experimentos de EM/EM, se desalinizó la mezcla de péptidos tríptica y se concentró en dispositivos ZipTip_{C18} (Millipore). Tras la elución con metanol al 60% más ácido fórmico al 1%, se introdujeron 4,5 µl de la mezcla de péptidos tríptica en un capilar de borosilicato recubierto de oro (Proxeon Biosystems) y se analizó en un espectrómetro de masas de trampa iónica LCQ Thermo (ThermoFinnigan) equipado con una fuente de nano-ESI. Se fijó el voltaje del capilar a 46 V y el voltaje de pulverización a 1,8 kV. Se atraparon las señales más estables del espectro de masa de exploración completa y se fragmentaron mediante disociación inducida por colisión a baja energía (CID), oscilando la energía de colisión normalizada entre el 22 y el 24%.

- 15 También se identificaron algunas proteínas mediante CL-EM/EM usando un espectrómetro de masas de trampa iónica LCQ DECA XP Plus (ThermoFinnigan) equipado con una fuente iónica de ESI. Se procesaron las separaciones cromatográficas seguidas por una analizador de EM en una columna C18 Luna, 150 x 2,0 mm (Phenomenex), usando un instrumento Surveyor (automuestreador y bomba) (ThermoFinnigan) con un volumen de inyección de 10 µl y una velocidad de flujo de 200 µl/min.

- 20 Para todos los análisis de datos de EM/EM, se usó el software Bioworks 3.0 (ThermoFinnigan), y se compararon las secuencias resultantes con las secuencias de proteínas humanas presentes en las bases de datos EBI usando el software FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>; Johnson R *et al.*, 2005).

Análisis estadístico

- 25 Se calcularon todos los datos estadísticos usando el software GraphPad Prism. Se presentan los datos como media ± EEM (error estándar de la media). Se usó una prueba de la t bilateral para datos independientes para evaluar la significación de la expresión de proteínas diferentes entre tejidos pancreáticos con PDA y normales. Se consideró un valor de P bilateral de <0,05 estadísticamente significativo.

Resultados

- 30 Se usó el proteoma de la línea celular CF-PAC-1, usada a menudo como modelo para la proliferación celular y expresión de proteínas asociadas a PDA (Bouvet M *et al.*, 2001; Szepeshazi K *et al.*, 2005), para identificar la presencia de proteínas y anticuerpos que están asociados a PDA usando sueros de pacientes con PDA como fuente de anticuerpos primarios.

- 35 Se analizaron los extractos de proteína de esta línea celular mediante 2-DE, definiendo un mapa bidimensional representativo mediante tinción con plata. Este enfoque permite separar las proteínas contenidas en este extracto como "puntos" que pueden clasificarse según su intensidad y posición en el gel 2-DE, y para los cuales puede determinarse aproximadamente la cantidad, el peso molecular y el pI de las proteínas.

- 40 Se transfirieron los geles 2-DE sobre una membrana con el fin de analizarlos mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un panel de sueros de o bien pacientes con PDA o bien pacientes sin PDA (incluyendo sujetos sanos, pacientes afectados por otros cánceres y pacientes afectados por pancreatitis crónica). La comparación entre los diferentes mapas de puntos (y entre la imagen de tinción con plata y la correspondiente imagen de inmunotransferencia de tipo Western de los geles 2-DE) conduce a la identificación de puntos asociados a PDA que pueden caracterizarse adicionalmente, por ejemplo mediante análisis de espectrometría de masas de los fragmentos de proteína extraídos de tales puntos usando enzimas que digieren las proteínas de una manera controlada (figura 1).

- 45 Usando este enfoque, se seleccionaron diez puntos y se caracterizó adicionalmente que se reconocían únicamente por anticuerpos séricos de pacientes con PDA (figura 2A). Se restringió el análisis a anticuerpos de IgG humanos puesto que el anticuerpo secundario que se ha usado es específico para este isotipo. Se cortaron los diez puntos de

los geles preparativos y se analizaron mediante EM MALDI-TOF para identificar a qué proteínas humanas corresponden. Usando este enfoque, se identificaron nueve proteínas diferentes como antígenos asociados a PDA. Dos pares de puntos correspondían a isoformas de la misma proteína y un punto contenía secuencias que pertenecían a dos proteínas diferentes no separadas suficientemente mediante 2-DE. Todos estos puntos estaban ausentes o eran casi indetectables en la inmunotransferencia de tipo Western realizada usando sueros control. Se identificaron anticuerpos primarios que se unen una o más de las proteínas en estos puntos en un porcentaje significativo de sueros obtenidos de pacientes con PDA (tabla I).

Entre estas proteínas antigénicas asociadas a PDA, puede hacerse una distinción entre dos categorías de proteínas, según el tipo de actividades biológicas para las que se identifican en la bibliografía. Un primer grupo de proteínas comprende enzimas metabólicas: alfa-enolasa (presente en dos puntos, correspondiendo cada uno a una isoforma específica), trifosfato isomerasa (presente en dos puntos, correspondiendo cada uno a una isoforma específica), deshidrogenasa-1 retiniana, glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa, factor Tu de elongación e isocitrato deshidrogenasa. Un segundo grupo de proteínas se han caracterizado en su mayoría como proteínas del citoesqueleto: queratina tipo I del citoesqueleto 10 y cofilina 1.

Además de los hallazgos obtenidos usando células CF-PAC-1 y sueros humanos, se compararon extractos pancreáticos que se han obtenido de sujetos sanos y con PDA, en inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos purificados contra estas proteínas (y no sueros humanos) como anticuerpo primario. Este análisis permite una cuantificación de la cantidad total de una proteína (y no se restringe a una isoforma), pero muestra que estas proteínas se sobreexpresaban, en diversos grados, en los tejidos pancreáticos obtenidos de biopsias de pacientes con PDA (tabla I).

El valor de diagnóstico de estas proteínas (y de la presencia de anticuerpos específicos contra las mismas en sueros de pacientes con PDA) se ha evaluado adicionalmente distinguiendo la presencia de los puntos para cada proteína entre sueros de PDA obtenidos de pacientes agrupados según el estadio de la enfermedad, y usando sueros de pacientes con pancreatitis crónica como controles.

El análisis de inmunotransferencia de tipo Western mostró que la presencia y cantidad de autoanticuerpos contra las diferentes proteínas no está distribuida uniformemente entre pacientes en diferentes estadios de PDA (figura 2B). Estaban ausentes autoanticuerpos contra la mayoría de las proteínas en los sueros control, mientras que la frecuencia de sueros de PDA que los contienen aumenta ligeramente en pacientes en el estadio II de PDA para la mayoría de las proteínas (por debajo del 25%) con la excepción notable de ENOA 1/2. Estas frecuencias en el perfil de producción de autoanticuerpos se confirman en los estadios más avanzados, en los que de nuevo los autoanticuerpos contra las isoformas de alfa-enolasa son los más interesantes, dado el aumento constante en la frecuencia en el estadio III y estadio IV de PDA.

Conclusiones

Un enfoque basado en análisis serológico que combinó la obtención del perfil de expresión 2-DE de una línea celular de tumor pancreático humana (CF-PAC-1) y análisis de inmunotransferencia de tipo Western (usando, como anticuerpos primarios, IgG humana en el suero de pacientes con PDA) permitió la identificación de un número restringido de proteínas humanas y de sus isoformas contra las que los pacientes con PDA producen una respuesta humoral específica. Con sólo una excepción (AL1A1), la expresión de estas proteínas en biopsias de PDA estaba regulada por incremento. Además, la producción de anticuerpos contra estas proteínas asociadas a PDA, al menos para algunos antígenos, parece aumentar significativamente en estadios avanzados de la enfermedad.

Estos resultados demuestran la idoneidad de los enfoques serológicos en la identificación de posibles marcadores para el diagnóstico de PDA temprano que son, en este caso, en su mayoría intracelulares. El mecanismo mediante el cual el sistema inmunitario reacciona frente a proteínas intracelulares no está claro, pero puede depender del entorno único creado por el tumor que puede alterar la localización de enzimas intracelulares en células tumorales.

La cofilina 1 (COF1) desempeña un papel la motilidad, el remodelamiento de la actina y el cáncer como enzima de despolimerización de la actina implicada en la formación de invadopodios (Yamaguchi H *et al.*, 2005) y puede requerirse para la direccionalidad de células tumorales en respuesta a estimulación con factor de crecimiento o quimiotáctica (Mouneimne G *et al.*, 2004). Se ha observado previamente sobreexpresión de COF1 en asociación con modelos animales de PDA (Cecconi D *et al.*, 2003; Sinha P *et al.*, 1999).

La alfa-enolasa es una enzima metabólica altamente conservada que tiene múltiples propiedades y se detecta en diferentes contextos (Pancholi V, 2001; Piast M *et al.*, 2005; Terrier B *et al.*, 2007). Puede expresarse sobre la superficie celular como un receptor de plasminógeno (Lopez-Aleman R *et al.*, 2003) y reconocerse por células B, actuando posiblemente como activador de células B (Babu J *et al.*, 2002). Se han detectado dos isoformas en adenocarcinoma pancreático pero sin describirse sus propiedades moleculares en cuanto a modificaciones postraduccionales (Shen J *et al.*, 2004).

Se han identificado autoanticuerpos contra alfa-enolasa, que existen como única isoforma o en múltiples isoformas (pero sin pruebas de la expresión específica de isoformas fosforiladas de ENOA), en muchos modelos de enfermedad y biológicos diferentes, tales como en retinopatía asociada a cáncer (Adamus G *et al.*, 1998; Adamus G *et al.*, 1996), cáncer de pulmón de células no pequeñas y otros cánceres no pancreáticos (documento WO 07/072219; documento US20070172487: He P *et al.*, 2007), cirrosis biliar (Akisawa N *et al.*, 1997), encefalopatías (Fujii A *et al.*, 2005) y enfermedades autoinmunitarias (Ballot E *et al.*, 2003; Bogdanos D *et al.*, 2004; Gitlits V *et al.*, 2001). Se han estudiado las propiedades de la alfa-enolasa y de los autoanticuerpos o anticuerpos específicos de la alfa-enolasa usando presentación de fago (Arza B *et al.*, 1997; Kemp E *et al.*, 2002) o péptidos (Adamus G *et al.*, 1998; Sato N *et al.*, 2000; Walter M *et al.*, 1995; Fujii A *et al.*, 2005).

Los presentes resultados demuestran que las isoformas específicas de alfa-enolasa y los anticuerpos para detectarlas son una herramienta particularmente útil para el diagnóstico de PDA, dada la frecuencia y la producción específica de autoanticuerpos contra dos isoformas específicas de esta proteína (ENOA 1/2) en los sueros de pacientes con PDA (tabla I y figura 2B). Los anticuerpos pueden ser específicos para un epítipo común a todas, o la mayoría, de las isoformas (como los anticuerpos purificados usados en el experimento) o un epítipo que distingue las isoformas asociadas a PDA de la otras (como las presentes en los sueros de PDA). Además, la evolución del PDA desde el estadio II hasta el IV se caracteriza por una potenciación altamente significativa de la producción de autoanticuerpos contra ENOA 1/2, lo que sugiere una correlación directa con el tamaño del tumor y la capacidad de crecimiento.

Un análisis más detallado de tales isoformas es importante no sólo para establecer el valor predictivo de los autoanticuerpos para el diagnóstico de PDA, sino también para tener un entendimiento más profundo de los mecanismos moleculares que las vinculan con PDA y con posibles enfoques terapéuticos contra este cáncer.

Ejemplo 2: Análisis de isoformas de alfa-enolasa detectadas mediante autoanticuerpos en células CF-PAC-1

Materiales y métodos

Análisis EM

Se cortaron los puntos de geles 2-DE preparativos y se analizaron mediante ionización por desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Se destiñeron las proteínas durante la noche con una disolución de bicarbonato de amonio 0,025 mol/l y acetonitrilo al 50% y entonces se digirieron *in gel* con tripsina (Promega, Madison, WI) tal como se describió anteriormente (Hellman U *et al.*, 1995). Para EM por MALDI-TOF, se aplicaron 0,5 µl de cada mezcla de péptidos a un disco diana y se dejó secar al aire. Posteriormente, se aplicaron 0,5 µl de disolución de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico al 1% p/v en acetonitrilo al 30%, TFA al 0,1%) a la muestra seca y de nuevo se dejó secar. Se obtuvieron espectros usando un espectrómetro de MALDI-TOF Bruker Reflex III (Bremen, Alemania). La interpretación de los espectros de EM de digestos de proteínas se realizó mediante "obtención de la huella peptídica" (PMF) usando el software MS-Fit.

Análisis de fosforilación

Se realizó el análisis de secuencia de proteína de alfa-enolasa humana usando el siguiente software disponible en Internet: NetPhos [<http://www.cbs.dtu.dk/services/>; (Blom N *et al.*, 1999)], NetPhosK [<http://www.cbs.dtu.dk/services/>; (Blom N *et al.*, 2004)], dbPTM [<http://dbPTN4.mbc.nchi.cdu.tw/>; (Lee T *et al.*, 2006)], PPSP [<http://bioinformatics.lcd-ustc.org/PPSP/>; (Xue Y *et al.*, 2006)] y GPS [http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps_web/predict.php; (Xue Y *et al.*, 2005)].

Se realizó el tratamiento con fosfatasa usando λ PPase (New England Biolabs Inc.) tal como se describió (Yamagata A *et al.*, 2002) con las siguientes modificaciones. Se resuspendieron células CF-PAC-1 (30×10^6) sedimentadas durante 15 horas en 1 ml de tampón de lisis (NP-40 al 1% p/v, SDS al 1% p/v, Tris 50 mM pH 7,6 y cóctel inhibidor de proteasas NaCl 150 mM). Se llevó el lisado (120 µl, correspondientes a 2 mg de proteína) a un volumen final de 1240 µl con agua desionizada, luego se añadieron 20 µl de disolución de $MnCl_2$ 20 mM y 20 µl de tampón λ PPase. Después de cada adición, se mezcló suavemente la disolución. Se dividió la mezcla en alícuotas, y se añadieron 600 unidades de λ PPase a una alícuota. Tras mezclar, se incubaron las alícuotas durante 15 horas a 30°C. Se precipitaron las proteínas con cloroformo y acetona y se usaron para el análisis 2-DE (véase el ejemplo 1).

Se realizó la detección a base de colorante de fosfoproteínas en geles 2-DE usando colorante fluorescente de fosfoproteína ProQ (Molecular Probes) y con tinte Sypro Ruby (Bio-Rad) para la detección de proteínas totales tal como se describe en las instrucciones del fabricante y en la bibliografía (Wu J *et al.*, 2005). Brevemente, tras 2-DE, se realizó la tinción con Pro-Q en primer lugar fijando los geles en metanol al 50%/ácido acético al 10% 30 min. Entonces se lavó el gel con agua destilada y se sometió a tinción de fosfoproteína Pro-Q Diamond durante 4 horas. Se realizó el destañido con lavados sucesivos de acetato de sodio 50 mM, pH 4,0 que contenía acetonitrilo al 20% antes de la tinción con colorante de fluorescencia Sypro Ruby (durante la noche).

Análisis de la expresión de isoformas de ENOA en tejidos pancreáticos de biopsias

5 Se homogeneizaron tejidos pancreáticos obtenidos de biopsias de o bien individuos sanos o bien de pacientes con PDA (estadio II) (T18 basic UltraTurrax, IKA,) sobre hielo, en 400 μ l de tampón de lisis que contenía urea 5 mol/l, tiourea 2 mol/l, CHAPS al 4% p/v, tampón IPG al 2% v/v a pH no lineal 3-10, ditioneitol (DTT) 0,08 mol/l, mezcla de nucleasa s 10 μ l/ml y trazas de azul de bromofenol. Tras la sonicación con un sonicador de ultrasonidos (Hielscher UP200S, 3 \times 40 s, amplitud 40%, ciclo 0,5 Hielscher Ultrasonics GmbH), se centrifugó la mezcla (13000 rpm, 30 minutos a 4°C) con la disolución de proteína contenida en el sobrenadante.

10 Se midió la concentración de proteína con el ensayo Bradford. Se procesaron treinta μ g de extracto de proteína sobre un gel pre-formado NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris pequeño, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se incubó durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-alfa-enolasa 19/12⁸ (Moscato S et al., 2000) y se reveló en la inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió en el ejemplo 1.

Producción de ENOA con etiqueta de histidina recombinante (rENOA).

15 Se purificó la proteína recombinante a partir de células de *E. coli* transfectadas con un plásmido que codifica para la secuencia de ENOA humana (faltando sólo los primeros nueve aminoácidos) fusionada a una etiqueta de histidina. Brevemente, se recogieron las células bacterianas de 1 litro de cultivo mediante centrifugación y se resuspendieron los sedimentos en 20 ml de tampón de unión nativo (NBB, fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 500 mM, pH 7,8) con la adición de lisozima (100 μ g/ml) y sarcosil al 0,7%. Se agitó lentamente la suspensión durante 15 minutos a 4°C. Se sonicó el lisado celular sobre hielo con diez pulsos de 40 segundos a alta intensidad. Se centrifugó el lisado a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C para sedimentar la fracción insoluble, que se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis de guanidinio (clorhidrato de guanidina 6 M, fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 7,8), enriquecido con inhibidores de proteasas, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el lisado a la columna equilibrada (columna de agarosa Ni-NTA, Invitrogen) para permitir la unión a la resina durante 30 minutos a 4°C usando rotación suave. Se lavó la resina dos veces con NBB y dos veces con tampón de lavado nativo (NWB; NBB a pH 6,0) seguidas. Se realizó la elución con 10 ml de tampón de elución de imidazol (350 mM pH 6= Producción de ENOA con etiqueta de histidina recombinante (rENOA). Se dializaron las fracciones eluidas en agua estéril, entonces se liofilizaron y resuspendieron en disolución tamponada con fosfato de Dulbecco libre de pirógeno estéril (DPBS, Sigma). Se almacenaron alícuotas a -20°C. El nivel de endotoxina era inferior a 0,03 EU/ml en el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (Pyrogen; BioWhittaker).

30 Análisis de la expresión de isoformas de ENOA en CF-PAC-1 usando sueros de pacientes e inmunotransferencia de tipo Western

Se electrotransfirieron geles 2-DE de CF-PAC-1 sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare) tal como se describió anteriormente. Tras bloquear durante 1 h con TBS que contenía leche en polvo desnatada al 5%, se incubaron las inmunotransferencias con conjuntos de tres sueros de pacientes ENOA 1/2+ (diluidos 1:100 en TBS) en diferentes condiciones.

35 En una serie de experimentos, en primer lugar se incubó el conjunto de sueros durante 15 horas a 4°C sobre una agitadora con 20 μ g/ml de alfa-enolasa recombinante (rENOA) antes de realizar la incubación con la membrana. En otra serie de experimentos, en primer lugar se incubó la membrana con 2 ml de PBS que contenía 600 unidades de λ PPase, 40 μ l de disolución de MnCl₂ 20 mM y 40 μ l de tampón λ PPase durante 15 horas a 30°C. Se bloquearon las membranas de nuevo durante 1 hora, se lavaron tres veces durante 15 minutos con TTBS y se incubaron con un conjunto de los sueros (dilución 1:100).

40 Se reveló la unión de anticuerpos en los sueros a isoformas de ENOA usando anticuerpos anti-ser humano marcados en la inmunotransferencia de tipo Western tal como se describe en el ejemplo 1. Como control de la cantidad de ENOA inmovilizada, se estudió con sonda de nuevo la membrana con los anticuerpos monoclonales murinos anti-enolasa 19/12⁸ (véase el ejemplo 1).

45 Resultados

Tras demostrar que se detectan específicamente dos isoformas de alfa-enolasa humana mediante anticuerpos en los sueros de pacientes con PDA, se estudiaron las características que caracterizan a tales isoformas (y cualquier otra isoforma de esta proteína que esté presente en células CF-PAC-1) usando diferentes enfoques.

50 La comparación de la inmunotransferencia de tipo Western obtenida usando el anticuerpo purificado contra alfa-enolasa o los sueros de diferentes pacientes con PDA, la tinción con plata de geles 2-DE y el análisis de espectrometría de masas mostraron que 4 puntos adicionales, correspondientes a isoformas adicionales de alfa-enolasa no asociadas a PDA, estaban presentes en los geles 2-DE, teniendo un peso molecular similar pero valores de pI experimentales inferiores a ENOA 1/2 (tabla II). Se obtuvieron estas pruebas usando extractos celulares de

CF-PAC-1 o MiaPaCa-2 en análisis de gel 2-DE.

Los péptidos obtenidos de tales puntos eran idénticos a fragmentos de ENOA (y claramente distintos de la gamma-enolasa humana sumamente similar; figura 3), confirmando la prueba de inmunotransferencia de tipo Western que los puntos deben corresponder a isoformas de ENOA, estando sólo ENOA 1/2 asociadas a PDA. Las modificaciones postraduccionales son características que a menudo distinguen una isoforma de otra. El análisis preliminar parecía excluir la glicosilación (dados los cambios limitados en el peso molecular) y sugirió modificaciones de fosforilación (dada la disminución del pI).

La secuencia de alfa-enolasa humana contiene varios residuos de Tirosina, Serina y Treonina que son posibles dianas para la fosforilación por diferentes cinasas. Se sometió a prueba esta hipótesis exponiendo el extracto de proteína a una fosfatasa ampliamente activa antes de la separación 2-DE para observar si había algún cambio en la intensidad de los puntos detectados usando un anticuerpo independiente de fosforilación, tal como se muestra en la bibliografía para otras proteínas (Kumar Y *et al.*, 2004). De hecho, se redujo claramente la intensidad de los puntos de ENOA correspondientes a la mayoría de isoformas ácidas (es decir, las ENOA 1/2 asociadas a PDA y la isoforma 3 de ENOA; tabla II) en extractos celulares de CF-PAC-1 tratados previamente con fosfatasa. Además, el análisis de espectrometría de masas de la isoforma 3 de ENOA (más abundante que ENOA 1/2) mostró que los residuos 55, 57, 200, 236, 237, 257 y 419 están fosforilados en esta isoforma (figura 4).

Notificaciones previas sobre fosforilación *in vivo* o *in vitro* de alfa-enolasa (Cooper J *et al.*, 1984; Eigenbrodt E *et al.*, 1983; Marcus K *et al.*, 2000; Rush J *et al.*, 2005; Stasyk T *et al.*, 2005; Molina H *et al.*, 2007) no pudieron indicar, en general, que al menos tres residuos específicos pueden fosforilarse simultáneamente, y, en particular, los residuos 55, 57, 200, 236, 237, 257 y 419 pueden encontrarse fosforilados en isoformas de ENOA. Además, la combinación de residuos fosforilados en la isoforma 3 de ENOA apenas podía predecirse usando un análisis basado en software de la secuencia de proteína de ENOA puesto que hay un alto número de sitios candidatos para fosforilación (figura 4). No puede excluirse que la isoforma 3 de ENOA pueda tener sitios de fosforilación adicionales no detectados en este estadio del análisis de espectrometría de masas, pero ENOA 1/2 deben contener residuos modificados postraduccionalmente (lo más probablemente fosforilados también, debido al valor pI y los hallazgos obtenidos usando fosfatasa) que las caracterizan de la isoforma 3 de ENOA.

Notablemente, más de uno de los péptidos obtenidos de la isoforma 3 de ENOA, para la que se determinó el estado de fosforilación y que contiene sitios de fosforilación candidatos, no muestra una modificación de este tipo. Por ejemplo, la Tirosina 44 que se identifica específicamente en la bibliografía que está fosforilada en una línea de células T leucémicas establecida (Rush J *et al.*, 2005) no se encontró fosforilada en la isoforma 3 de ENOA. De manera similar, el residuo 57 que se ha identificado como fosforilado en combinación con el residuo 63 (Molina H *et al.*, 2007), y no con el residuo 55, como en la isoforma 3 de ENOA (figura 4).

Se realizó un análisis adicional de la fosforilación en las isoformas de ENOA detectadas usando tanto sueros de PDA como anticuerpos específicos de ENOA comparando las imágenes obtenidas en la inmunotransferencia de tipo Western con las obtenidas usando colorantes que tiñen proteínas totales en el gel 2-DE (tinción con plata o Sypro Ruby) o específicos para fosfoproteínas (Pro-Q Diamond). Este análisis confirmó que sólo ENOA 1/2 y 3 están fosforiladas en células CF-PAC-1 (figura 5A; tabla II).

También se sometió a prueba la expresión de ENOA mediante inmunotransferencia de tipo Western sobre tejidos obtenidos de pacientes con PDA tratados quirúrgicamente (estadio II; n=7) y tejido pancreático normal (n=1), usando un anticuerpo anti-enolasa que se une a un epítipo específico común a las seis isoformas que se detectan en los sueros de pacientes con PDA. En seis de siete biopsias de PDA, se detectaron las seis isoformas de ENOA. Por el contrario, se detectaron claramente en el tejido pancreático normal sólo cuatro isoformas (ENOA 3, 4, 5 y 6) (figura 5B). De ese modo, puede concluirse que no sólo los pacientes con PDA producen anticuerpos contra ENOA 1/2, sino también que estas isoformas se sobreexpresan significativamente en tejidos pancreáticos con PDA.

Se investigó además la reactividad de sueros de pacientes con PDA contra ENOA fosforilada usando extractos celulares de CFPAC-1 en 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western en el alcance del entendimiento si esta reactividad se dirige específicamente a sus epítipos fosforilados. Puesto que los sueros de paciente con PDA reaccionaron frente a las seis isoformas, pueden contener anticuerpos que reaccionan frente a epítipos o bien fosforilados o bien no fosforilados.

En una primera serie de experimentos, se preincubaron los sueros con ENOA humana recombinante, que no contenía residuos fosforilados, para observar si la exposición a antígenos de ENOA altera la capacidad de los sueros de reconocer isoformas de ENOA en la línea celular pancreática de referencia. De hecho, el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de dos DE reveló que ENOA no fosforilada redujo marcadamente la reactividad sólo frente a las isoformas 3, 4, 5 y 6, sin afectar a la reactividad frente a las isoformas 1/2 de ENOA. Esta evidencia se confirmó adicionalmente en otra serie de experimentos en los que se preincubó la membrana con una fosfatasa (λ PPase) para confirmar que los sueros de pacientes contienen anticuerpos que reaccionan específicamente frente

a isoformas 1/2 de ENOA fosforiladas. En ausencia de λ PPase, los sueros reconocieron todas las isoformas de ENOA, mientras que el tratamiento con λ PPase redujo marcadamente la reactividad de los sueros frente a ENOA 1/2 (figura 6).

5 Puesto que el AcM anti-ENOA detectó por igual todas las isoformas en membranas tratadas o no tratadas, (datos no mostrados), estos datos demuestran que los anticuerpos en los sueros de pacientes con PDA reaccionan específicamente frente a las isoformas 1/2 de ENOA fosforiladas.

Conclusiones

10 Usando diferentes enfoques de proteómicas, se han identificado múltiples isoformas de ENOA y anticuerpos contra las mismas (Adamus G *et al.*, 1998; Adamus G *et al.*, 1996; Akisawa N *et al.*, 1997; Ballot E *et al.*, 2003; Bryborn M *et al.*, 2005; Lubec G *et al.*, 2003; O'Dwyer D *et al.*, 2002). Sin embargo, estos informes no proporcionan una demostración clara de una asociación entre las posiciones y los estados de fosforilación con la producción de autoanticuerpos contra isoformas específicas durante la evolución de PDA.

15 Otros artículos notifican cambios en la intensidad y/o el número de puntos de alfa-enolasa que se detectan, por ejemplo usando sueros de pacientes en inmunotransferencia de tipo Western de geles 2-DE, asociados a tratamiento celular específico (Baty J *et al.*, 2005; Bottalico L *et al.*, 1993; Kanamoto T *et al.*, 2002) o enfermedades (Byrjalsen I *et al.*, 1999; Clauser K *et al.*, 1995; Nakanishi T *et al.*, 2006; Tanaka Y *et al.*, 2006; documento US20070172487), lo que sugiere que pueden deberse a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación.

20 En otros artículos, se indica la alfa-enolasa humana como una de las varias proteínas sobreexpresadas en muestras de PDA analizadas mediante geles 2-DE y confirmadas al nivel de ARNm e inmunológica, pero sin mención de las fosforilaciones específicas que caracterizan a las isoformas de alfa-enolasa asociadas a PDA (documento WO04/55548; Shen J *et al.*, 2004; Nakanishi T *et al.*, 2006; Mikuriya K *et al.*, 2007).

25 Entre el gran número de modificaciones postraduccionales detectadas en alfa-enolasa (tabla III), se ha detectado fosforilación tanto *in vivo* e *in vitro* en la bibliografía antigua (Cooper J *et al.*, 1984; Coussens P *et al.*, 1985; Eigenbrodt E *et al.*, 1983; Golden A *et al.*, 1986). Más recientemente, se han detectado dos isoformas fosforiladas de alfa-enolasa usando geles 2D, un anticuerpo de ratón anti-fosfotirosina comercial (clon 4G10, cód. 05-321; Biomol) y espectrometría de masas en plaquetas humanas (Marcus K *et al.*, 2000). Se ha detectado una única variante fosforilada de alfa-enolasa en células tratadas con TGF beta I (línea celular MCF-7) usando geles 2D, radiomarcaje y espectrometría de masas (Stasyk T *et al.*, 2005) o en células MIAPaCa (una línea celular de cáncer pancreático) en las que disminuye la fosforilación de enolasa tras el tratamiento con flavonoides (Lee L *et al.*, 2002). Además, dos sitios de fosforilación ubicados en los residuos de Tirosina (44 y 286; Rush J *et al.*, 2005) o residuos de Tirosina y Serina (57 y 63; Molina H *et al.*, 2007).

Sin embargo, ninguno de estos documentos ha asociado a PDA con la fosforilación adicional de isoformas de alfa-enolasa ya fosforiladas en al menos tres posiciones, y con el anticuerpo que se une a las mismas.

35 **Ejemplo 3: Efectos de anticuerpos que se unen a alfa-enolasa sobre el crecimiento y proliferación de líneas celulares transformadas que expresan isoformas fosforiladas de alfa-enolasa**

Materiales y métodos

Ensayo para la proliferación de líneas celulares

40 Se realizó el ensayo *in vitro* de proliferación celular con las líneas celulares indicadas sembrando $2-10 \times 10^3$ células/pocillo en microplacas de 96 pocillos en medio de cultivo celular completo (RPMI-1640 con suero bovino fetal al 10%) con o sin el anticuerpo monoclonal anti-alfa-enolasa 72/1 (Moscato S *et al.*, 2000) o anticuerpo monoclonal control de isotipo coincidente de IgG1 de ratón (R&D Systems) usado como control negativo.

Tras 44 ó 68 horas, se añadieron 20 μ l de disolución de metil-tetrazolio (MTT; 5 mg/ml) a cada pocillo durante 4 horas adicionales a 37°C. Se eliminó el medio y se disolvieron las células con DMSO. Se leyeron las placas en el espectrofotómetro a 540 nanómetros.

45 Resultados

Se sometieron a prueba los efectos de un anticuerpo anti-alfa-enolasa sobre el crecimiento de líneas celulares que presentan diferentes perfiles de expresión de alfa-enolasa, tal como se determinó mediante 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western, midiendo la incorporación de MTT, un compuesto que se incorpora en células viables y se correlaciona con proliferación, metabolismo y crecimiento celular activo.

Usando un ensayo colorimétrico basado en MTT, se obtiene una inhibición significativa de la proliferación celular en las líneas celulares transformadas que expresan las seis isoformas, independientemente de su origen pancreático o no pancreático. Usando un anticuerpo monoclonal control de isotipo coincidente de IgG1 o una línea celular que no expresa las tres isoformas fosforiladas de ENOA, el efecto es mínimo (tabla IV).

- 5 Por tanto, los anticuerpos anti-alfa-enolasa pueden inhibir (al menos parcialmente) el crecimiento y la proliferación de líneas celulares que tienen el perfil de fosforilación específico de alfa-enolasa detectado en muestras biológicas asociadas a PDA (tales como sueros o tejidos de biopsias).

Conclusiones

- 10 Aunque generalmente considerada como una proteína citoplasmática, la alfa-enolasa puede expresarse como una proteína biológicamente activa en la superficie celular (Arza B *et al.*, 1997; Bergman A *et al.*, 1997; Moscato S *et al.* 2000; Lopez-Aleman R *et al.*, 2003) así como un factor soluble (Babu J *et al.*, 2002; Demir A *et al.*, 2005).

- 15 Los datos *in vitro* muestran que el crecimiento de líneas celulares transformadas se ralentiza mediante la unión de anticuerpos a epítomos presentes en las isoformas de alfa-enolasa expresadas en el espacio extracelular (como un receptor de superficie celular y/o como una proteína soluble), sólo si las líneas celulares expresan isoformas fosforiladas de alfa-enolasa.

- 20 Por tanto, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a células que presentan isoformas de alfa-enolasa fosforiladas puede inhibir la proliferación de líneas celulares transformadas. Este mecanismo para controlar la proliferación celular parece estar presente no sólo en PDA sino también en otras formas de cánceres que presentan tales características moleculares, y pueden seleccionarse como diana mediante anticuerpos monoclonales apropiados para aplicaciones terapéuticas relacionadas con cáncer, tales como la preparación de medicamentos para el tratamiento de PDA y métodos para el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con PDA.

Tabla 1. Proteínas reconocidas por sueros de pacientes con PDA como antígenos

2-DE, inmunotransferencia de tipo Western y análisis de espectrometría de masas de extractos celulares de CF-PAC-1					Inmunotransferencia de tipo Western de extractos pancreáticos ^b	
Descripción (SWISSPROT Locus, n.º de registro)	Puntos distintos (n.º) ^a	Puntos que se reconocen por los sueros de			Normal	PDA (valor de P) ^c
		Sujetos sanos (%)	Paciente sin PDA (%)	Pacientes con PDA (%)		
Alfa-enolasa (ENO_AHUMAN, P06733)	2 (n.º 1 y 2)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	41/70 (58%)	13,5±0,2	33±7 (< 0,05)
Triosafosfato-isomerasa (TPIS_HUMAN, P60174)	2 (n.º 3 y 4)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	16/70 (23%)	15,5±0,6	28±3 (<0,05)
Queratina tipo I del citoesqueleto 10 (K1C10_HUMAN, P13645)	1 (n.º 5)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	15/70 (21%)	3,5±0,6	33±4 (<0,005)
Deshidrogenasa-1 retiniana (AL1A1_HUMAN, P00352)	1 (n.º 6)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	14/70 (20%)	21,2±0,6	18±1(=0,05)
Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PD_HUMAN, P11413)	1 (n.º 7)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	9/70 (13%)	0,6±0,06	17,5±5 (< 0,05)
Factor Tu de elongación (EFTU_HUMAN, P49411)	1 (n.º 8)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	8/70 (11%)	2±0,6	32±9 (< 0,05)

(continuación)

2-DE, inmunotransferencia de tipo Western y análisis de espectrometría de masas de extractos celulares de CF-PAC-1					Inmunotransferencia de tipo Western de extractos pancreáticos ^b	
Descripción (SWISSPROT Locus, n.º de registro)	Puntos distintos (n.º) ^a	Puntos que se reconocen por los sueros de			Normal	PDA (valor de P) ^c
		Sujetos sanos (%)	Paciente sin PDA (%)	Pacientes con PDA (%)		
Isocitratodeshidrogenasa (IDHC_HUMAN, 075874)	1 (n.º 9)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	9/70 (10%)	3±0,6	28±8 (< 0,05)
Transgelina-2 (TAGL2_HUMAN, P37802)	1 ^d (n.º 10)	0/40 (0%)	0/30 (0%)	19/70 (27%)	ND	ND
Cofilina 1 (COF1_HUMAN, P23528)					9±0,6	42±5 (< 0,005)

ND: No determinado

^a Detectado mediante tinción con plata e inmunotransferencia de tipo Western en geles 2-DE como específico de PDA (véase la posición de los números de punto correspondientes en la figura 1B)

^b Se realizó la inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos específicos para cada proteína. La intensidad de líneas reactivas se expresa como unidades arbitrarias de intensidad de línea normalizada (media de tres experimentos ± EEM).

^c Se evaluó la significación estadística de la intensidad de línea normalizada de las proteínas seleccionadas usando la prueba de la t bilateral para datos dependientes

^d Las proteínas se localizan conjuntamente en el mismo punto.

Tabla II. Identificación de isoformas de ENOA reconocidas por sueros de pacientes con PDA

Punto de ENOA n.º	2-DE y espectrometría de masas			2-DE y análisis de fosforilación	
	Peso molecular (kDa) ^a	<i>pI</i> ^b	Puntuación para péptidos coincidentes ^c (cobertura de secuencia, %)	Intensidad de puntos en inmunotransferencia de tipo Western (% de la intensidad total)	
				Sin λPPase	600 U de λPPase
1	49,2	6,16	290 (18%)	8,5%	0%
2	49,0	6,30	365 (24%)	10,9%	1,9%
3	48,9	6,58	595 (39%)	15,1%	6,2%

(continuación)

Punto de ENOA n.º	2-DE y espectrometría de masas			2-DE y análisis de fosforilación	
	Peso molecular (kDa) ^a	pI ^b	Puntuación para péptidos coincidentes ^c (cobertura de secuencia, %)	Sin λPPase	600 U de λPPase
4	48,9	6,80	1007 (60%)	65,5%	91,9%
5	48,9	7,26	1127 (65%)		
6	48,8	7,60	449 (27%)		
Análisis de CL-EM/EM					
<p>^a El valor para alfa-enolasa no modificada postraduccionalmente, humana es de 47 kD</p> <p>^b El valor para alfa-enolasa no modificada postraduccionalmente, humana es de 7,0</p> <p>^c La suma de las puntuaciones de iones de todos los péptidos no duplicados</p>					

5

Tabla III: Bibliografía seleccionada que describe modificaciones postraduccionales de alfa-enolasa distintas de fosforilación

Modificación	Referencia
Acetilación	Iwabata H <i>et al.</i> , 2005
Citrulinación	Kinloch A <i>et al.</i> , 2005
D-Asp	Takata T <i>et al.</i> , 2006
Modificación con 4-hidroxinonenal	Kappahn R <i>et al.</i> , 2006
Nitración	Casoni F <i>et al.</i> , 2005; Kanski J <i>et al.</i> , 2005; Shin S <i>et al.</i> , 2004
Oxidación	Butterfield <i>et al.</i> , 2006; Castegna A <i>et al.</i> , 2002; Ishii T y Uchida K, 2004; Perluigi M <i>et al.</i> , 2005
Tirosilación	Avram D <i>et al.</i> , 2004

Tabla IV: Resultados del ensayo de proliferación *in vitro*

Línea celular - Origen - n.º de depósito - Referencias	Inhibición del crecimiento celular (%)		Isoformas de ENOA (tal como se detectan por 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western)					
	anti-ENOA 48 horas	IgG control 48 horas	1	2	3	4	5	6
BxPC-3 - PDA escasamente diferenciado - n.º de ECACC 93129816 - Tan M <i>et al.</i> , 1986	37%)	0%	+	+	+	+	+	+
CF-PAC-1 - PDA diferenciado - n.º de ECACC 91112501 - Schoumacher <i>et al.</i> , 1990	29%	0%)	+	+	+	+	+	+
Mia-Pa-Ca-2 - PDA no diferenciado - n.º de ECACC 85062806 - Y unis A <i>et al.</i> , 1977	38%	0%	+	+	+	+	+	+
U937 - Línea celular de linfoma - n.º de ECACC 85011440 - Fischer D <i>et al.</i> 1980	38%	5%	+	+	+	+	+	+

(continuación)

	Inhibición del crecimiento celular (%)		Isoformas de ENOA (tal como se detectan por 2-DE e inmunotransferencia de tipo Western)					
MCF-7	15%	0%	-	-	-	+	+	+
- adenocarcinoma de mama	(2%)	(0%)						
- n.º de ECACC 86012803								
- Soule H <i>et al.</i> , 1973								

Lista de secuencias

- 5 <110> Ribovax Biotechnologies SA Bioline Diagnostici S.R.L.
- <120> ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS NOVEDOSOS ASOCIADOS A ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO
- <130> PAF05_aenolvar_WO
- <150> Documento EP 06121552.1
- 10 <151> 29-09-2006
- <150> Documento EP 06126726.6
- <151> 20-12-2006
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1
- <211> 434
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 20

ES 2 381 304 T3

Met Ser Ile Leu Lys Ile His Ala Arg Glu Ile Phe Asp Ser Arg Gly
 1 5 10 15

Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Phe Thr Ser Lys Gly Leu Phe Arg
 20 25 30

Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu
 35 40 45

Leu Arg Asp Asn Asp Lys Thr Arg Tyr Met Gly Lys Gly Val Ser Lys
 50 55 60

Ala Val Glu His Ile Asn Lys Thr Ile Ala Pro Ala Leu Val Ser Lys
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Glu Gln Glu Lys Ile Asp Lys Leu Met Ile Glu
 85 90 95

Met Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110

Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Val Glu Lys Gly Val
 115 120 125

Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Asp Leu Ala Gly Asn Ser Glu Val Ile
 130 135 140

Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly
 145 150 155 160

Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Ala
 165 170 175

ES 2 381 304 T3

Asn Phe Arg Glu Ala Met Arg Ile Gly Ala Glu Val Tyr His Asn Leu
 180 185 190
 Lys Asn Val Ile Lys Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Lys Glu Gly Leu
 210 215 220
 Glu Leu Leu Lys Thr Ala Ile Gly Lys Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Val
 225 230 235
 Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Phe Arg Ser Gly Lys
 245 250 255
 Tyr Asp Leu Asp Phe Lys Ser Pro Asp Asp Pro Ser Arg Tyr Ile Ser
 260 265 270
 Pro Asp Gln Leu Ala Asp Leu Tyr Lys Ser Phe Ile Lys Asp Tyr Pro
 275 280 285
 Val Val Ser Ile Glu Asp Pro Phe Asp Gln Asp Asp Trp Gly Ala Trp
 290 295 300
 Gln Lys Phe Thr Ala Ser Ala Gly Ile Gln Val Val Gly Asp Asp Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Thr Asn Pro Lys Arg Ile Ala Lys Ala Val Asn Glu Lys Ser
 325 330 335
 Cys Asn Cys Leu Leu Leu Lys Val Asn Gln Ile Gly Ser Val Thr Glu
 340 345 350
 Ser Leu Gln Ala Cys Lys Leu Ala Gln Ala Asn Gly Trp Gly Val Met
 355 360 365
 Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Thr Phe Ile Ala Asp Leu
 370 375 380
 Val Val Gly Leu Cys Thr Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ala Pro Cys Arg
 385 390 395 400
 Ser Glu Arg Leu Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Glu Glu
 405 410 415
 Leu Gly Ser Lys Ala Lys Phe Ala Gly Arg Asn Phe Arg Asn Pro Leu
 420 425 430

Ala Lys

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

ES 2 381 304 T3

<400> 2

Met Ser Ile Glu Lys Ile Trp Ala Arg Glu Ile Leu Asp Ser Arg Gly
 1 5 10 15
 Asn Pro Thr Val Glu Val Asp Leu Tyr Thr Ala Lys Gly Leu Phe Arg
 20 25 30
 Ala Ala Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ile Tyr Glu Ala Leu Glu
 35 40 45
 Leu Arg Asp Gly Asp Lys Gln Arg Tyr Leu Gly Lys Gly Val Leu Lys
 50 55 60
 Ala Val Asp His Ile Asn Ser Thr Ile Ala Pro Ala Leu Ile Ser Ser
 65 70 75 80
 Gly Leu Ser Val Val Glu Gln Glu Lys Leu Asp Asn Leu Met Leu Glu
 85 90 95
 Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110
 Gly Val Ser Leu Ala Val Cys Lys Ala Gly Ala Ala Glu Arg Glu Leu
 115 120 125
 Pro Leu Tyr Arg His Ile Ala Gln Leu Ala Gly Asn Ser Asp Leu Ile
 130 135 140
 Leu Pro Val Pro Ala Phe Asn Val Ile Asn Gly Gly Ser His Ala Gly
 145 150 155 160
 Asn Lys Leu Ala Met Gln Glu Phe Met Ile Leu Pro Val Gly Ala Glu
 165 170 175
 Ser Phe Arg Asp Ala Met Arg Leu Gly Ala Glu Val Tyr His Thr Leu
 180 185 190
 Lys Gly Val Ile Lys Asp Lys Tyr Gly Lys Asp Ala Thr Asn Val Gly
 195 200 205
 Asp Glu Gly Gly Phe Ala Pro Asn Ile Leu Glu Asn Ser Glu Ala Leu
 210 215 220
 Glu Leu Val Lys Glu Ala Ile Asp Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Ile
 225 230 235 240
 Val Ile Gly Met Asp Val Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Arg Asp Gly Lys

- Baty JW *et al.* (2005). *Biochem J*, 389, 785-95.
- Baucr TW *et al.* (2005). *Cancer Res*, 65, 7775-81.
- Bhattacharyya S *et al.* (2004). *Neoplasia*, 6, 674-86.
- Bergman A *et al.*, (1997). *FEBS Lett*, 417, 17-20.
- 5 Blom N *et al.* (1999). *J Mol Biol*, 294, 1351-62.
- Blom N *et al.* (2004). *Proteomics*, 4, 1633-49.
- Bloomston M *et al.* (2006). *Cancer Res*, 66, 2592-9.
- Bogdanos DP *et al.* (2004). *J Autoimmune Dis*, 1, 4.
- Bottalico LA *et al.* (1993). *Arterioscler Thromb*, 13, 264-75.
- 10 Bouvet M (2004). *Ann Surg Oncol*, 11, 637-8.
- Bouvet M *et al.* (2001). *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 310-6.
- Brand R. (2001). *Cancer J*, 7, 287-97.
- Bruns CJ *et al.*. (2000). *Cancer Res*, 60, 2926-35.
- Brybom M *et al.* (2005). *Respir Res*, 6, 118.
- 15 Butterfield DA *et al.* (2006). *Neurobiol Dis*, 22, 223-32.
- Byrjalsen I *et al.* (1999). *Mol Hum Reprod*, 5, 748-56.
- Cao D *et al.* (2005). *Mod Pathol*, 18, 752-61.
- Casoni F *et al.* (2005). *J Biol Chem*, 280, 16295-304.
- Castegna A *et al.* (2002). *J Neurochem*, 82, 1524-32.
- 20 Cecconi D *et al.* (2003). *Electrophoresis*, 24, 4291-303.
- Chamrad D *et al.*, (2004). *Proteomics*. 4: 619-28.
- Chen R *et al.* (2005). *Mol Cell Proteomics*, 4, 523-33.
- Clauser K *et al.* (1995). *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 5072-6.
- Cohen S y Meropol N (2002). *Int J Gastrointest Cancer*, 32, 91-106.
- 25 Conrads T *et al.* (2002). *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 885-90.
- Cooper J *et al.* (1984). *J Biol Chem*, 259, 7835-41.
- Coussens P *et al.* (1985). *Mol Cell Biol*, 5, 2753-63.
- Demir A *et al.*, (2005) *Cell Tissue Res*, 322, 299-311.
- Drake C *et al.* (2006). *Adv Immunol*, 90, 51-81.
- 30 Dunn G *et al.* (2004). *Immunity*, 21, 137-48.
- Edberg D *et al.* (2005). *J Biol Chem*, 280, 8961-73.

- Eigenbrodt E *et al.* (1983). *Embo J*, 2, 1565-70.
- Faria S *et al.* (2004). *Semin Roentgenol*, 39, 397-411.
- Fischer D *et al.*, (1980). *J Immunol*. 125:463-5.
- Fujii A *et al.*, (2005). *J. Neuroimm.* 162 : 130-6.
- 5 Gitlits VM *et al.* (2001). *J Investig Med*, 49, 138-45.
- Goggins M (2005). *J Clin Oncol*, 23, 4524-31.
- Golden A *et al.*, (1986). *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 852-6.
- Gorg A *et al.* (2004). *Proteomics*, 4, 3665-85.
- Graham DR *et al.* (2005). *J Physiol*, 563, 1-9.
- 10 Gronborg M *et al.* (2006). *Mol Cell Proteomics*, 5, 157-71.
- Harris R *et al.* (2004). *Drug Development Research*. 61, 137-154.
- He P *et al.*, (2007). *Cancer Sci*. 98 : 1234-1240.
- Hellman U *et al.* (1995). *Anal Biochem*, 224, 451-5.
- Honda K *et al.* (2005). *Cancer Res*, 65, 10613-22.
- 15 Hong SH *et al.* (2004). *Cancer Res*, 64, 5504-10.
- Ishii T y Uchida K (2004). *Chem Res Toxicol*, 17, 1313-22.
- Iwabata H *et al.* (2005). *Proteomics*, 5, 4653-64.
- Jain M *et al.*, (2007). *Trends Biotechnol.*25: 307-16.
- Jimeno A y Hidalgo M (2006). *Mol Cancer Ther*, 5, 787-96.
- 20 Johnson R *et al.*, (2005). *Methods*. 35: 223-36.
- Kalume DE *et al.* (2003). *Curr Opin Chem Biol*, 7, 64-9
- Kanamoto T *et al.* (2002). *Embo J*, 21, 12,19-30.
- Kanski J *et al.* (2005). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H371-81.
- Kappahn R *et al.* (2006). *Exp Eye Res*. 83: 165-75.
- 25 Kemp EH *et al.* (2002). *Biochem Biophys Res Commun*, 298, 169-77.
- Kim S *et al.*, (2005). *Mol Cells*. 20: 17-29.
- Kinloch A *et al.* (2005). *Arthritis Res Ther*, 7, R1421-9.
- Klade CS *et al.* (2001). *Proteomics*, 1, 890-8.
- Kleef J *et al.*, (2006). *Pancreas*. 33 : 111-118.
- 30 Koomen JM *et al.* (2005). *Clin Cancer Res*, 11, 1110-8.
- Koopmann J *et al.* (2004). *Clin Cancer Res*, 10, 2386-92.

- Kumar Y *et al.* (2004). *Proteomics*, 4, 1672-83.
- Laffly E y Sodoyer R, (2005). *Hum Antibodies*. 14: 33-55.
- Laheru D y Jaffee E, (2005). *Nat Rev Cancer*. 5 : 459-67.
- Lee L *et al.* (2002). *Anticancer Res*. 22 : 1615-27.
- 5 Lee T *et al.* (2006). *Nucleic Acids Res*. 34 : D622-7.
- Leung T *et al.* (2005). *World J Gastroenterol*. 11: 5075-8.
- Levitzki A y Mishani E. (2006). *Annu Rev Biochim*. 75: 93-109.
- Lichtenfels R ct al. (2003). *Biochim Biophys Acta*. 1646: 21-31.
- Lobo E *et al.*, (2004). *J Pharm Sci*. 93: 2645-68.
- 10 Logtenberg T, (2007). *Trends Biotechnol*. Doi :10,1016/j.tibtech.2007,07,005.
- Lopez-Alemay R *et al.* (2003). *Thromb Haemost*. 90: 724-33.
- Lubec G *et al.* (2003). *Prog Neurobiol*. 69: 193-211.
- Machida K *et al.* (2003). *Mol Cell Proteomics*. 2: 215-33.
- Mandell JW. (2003). *Am J Pathol*. 163: 1687-98.
- 15 Mann M *et al.* (2002). *Trends Biotechnol*. 20 : 261-8.
- Marcus K *et al.* (2000). *Electrophoresis*. 21: 2622-36.
- Mikuriya K *et al.*, (2007). *Int J Oncol*. 30 : 849-855.
- Molina H *et al.*, (2007). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2199-2204.
- Moscato S *et al.* (2000). *Eur J Immunol*. 30 : 3575-84.
- 20 Mouneimne G *et al.* (2004). *J Cell Biol*. 166 : 697-708.
- Nakanishi T *et al.*, (2006). *J Chromatogr B Analyt Tec Biomed Life Sci*. 838: 15-20.
- Nilsson J *et al.*, (1997). *Protein Expr Purif*. 11: 1-16.
- O'Dwyer D *et al.* (2002). *Arch Physiol Biochem*. 110 : 94-8.
- Okusaka T *et al.*, (2006). *JOP J Pancreas*. 7: 332-6.
- 25 Pancholi V. (2001). *Cell Mol Life Sci*. 58 : 902-20.
- Perluigi M *et al.* (2005). *Mol Cell Proteomics*. 4 : 1849-61.
- Piast M *et al.* (2005). *Acta Biochim Pol*. 52 : 507-13.
- Qin Y *et al.* (1995). *Int J Cancer*. 60: 694-700.
- Rodriguez JA *et al.* (2005). *World J Surg*. 29: 297-305.
- 30 Rosty C y Goggins M (2005). *Methods Mol Med*. 103:189-97.
- Rubio-Viqueira B *et al.*, (2006). *Clin Cancer Res*. 12: 4652-61.

- Rush J *et al.* (2005). *Nat Biotechnol*, 23, 94-101.
- Sato N *et al.* (2000). *Cancer Chemother Pharmacol*. 46 Supl.: S86-90.
- Schmelzle K y White F (2006). *Curr Opin Biotechnol*, 17: 406-14.
- Schoumacher R *et al.* (1990). *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 4012-6.
- 5 Shen J *et al.* (2004). *Cancer Res*, 64, 9018-26.
- Shevchenko A *et al.* (1996). *Anal Chem*. 68 : 850-8.
- Shin S *et al.* (2004). *Proteomics*. 4 : 3359-68.
- Sinha P *et al.* (1999). *Electrophoresis*. 20 : 2952-60.
- Soule H *et al.*, (1973). *J Natl Cancer Inst*. 51: 1409-16.
- 10 Stasyk T *et al.* (2005). *Mol Biol Cell*. 16: 4765-80.
- Szpcshazi K *et al.* (2005). *Pancreas*. 31: 275-82.
- Takata T *et al.* (2006). *Biochem Biophys Res Commun*, 344: 263-71.
- Tanaka Y *et al.* (2006). *Microbiol Immunol*. 50 : 117-26.
- Terrier B *et al.*, (2007). *Autoimm Reviews*. 6: 176-182.
- 15 Unwin RD *et al.* (2003). *Proteomics*. 3 : 45-55.
- Walter M *et al.* (1995). *J Autoimmun*. 8 : 931-45.
- Wu J *et al.* (2005). *Electrophoresis*, 26, 225-37.
- Xia Q *et al.* (2005). *Biochem Biophys Res Commun*. 330: 526-32.
- Xue Y *et al.* (2006). *BMC Bioinformatics*, 7 : 163.
- 20 Xue Y *et al.* (2005). *Nucleic Acids Res*. 33: W184-7.
- Yamagata A *et al.* (2002). *Proteomics*. 2 : 1267-76.
- Yamaguchi H *et al.* (2005). *J Cell Biol*. 168: 441-52.
- Yezhelyev MV *et al.* (2004). *Clin Cancer Res*. 10 : 8028-36.
- Yokoi N *et al.*, (2005). *Cancer Res*. 65: 10371-10380.
- 25 Yu Y *et al.* (2005). *Oncology* 68: 79-86.
- Yunis A *et al.* (1977). *Int J Cancer*, 19:128-35.

REIVINDICACIONES

1. Isoforma de alfa-enolasa humana caracterizada porque está fosforilada en al menos 3 posiciones, en la que las 3 posiciones se escogen entre Treonina 55, Tirosina 57, Tirosina 200, Tirosina 236, Treonina 237, Tirosina 257 y Serina 419.
- 5 2. Anticuerpo que se une específicamente a una isoforma de alfa-enolasa según la reivindicación 1.
3. Anticuerpo según la reivindicación 2, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo.
4. Anticuerpo según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque está fusionado o conjugado a una molécula de marcador detectable.
- 10 5. Isoforma de alfa-enolasa humana según la reivindicación 1, o anticuerpo según la reivindicación 2, para su uso en el diagnóstico de adenocarcinoma ductal pancreático.
6. Kits para el diagnóstico de adenocarcinoma ductal pancreático (PDA), que comprenden la isoforma de alfa-enolasa humana según la reivindicación 1, y/o el anticuerpo según la reivindicación 2.
7. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según la reivindicación 2 ó 3.
- 15 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de adenocarcinoma ductal pancreático.

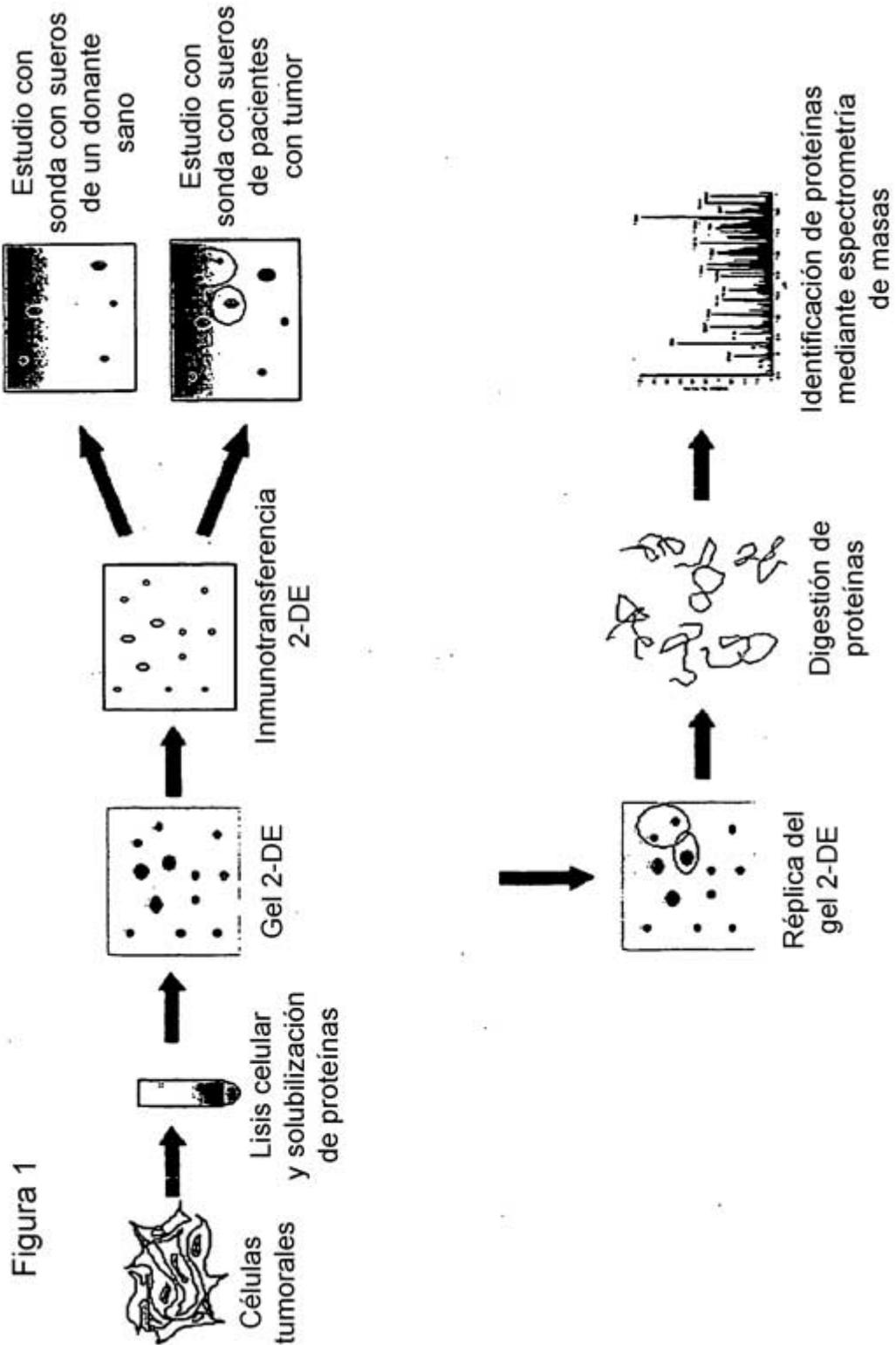
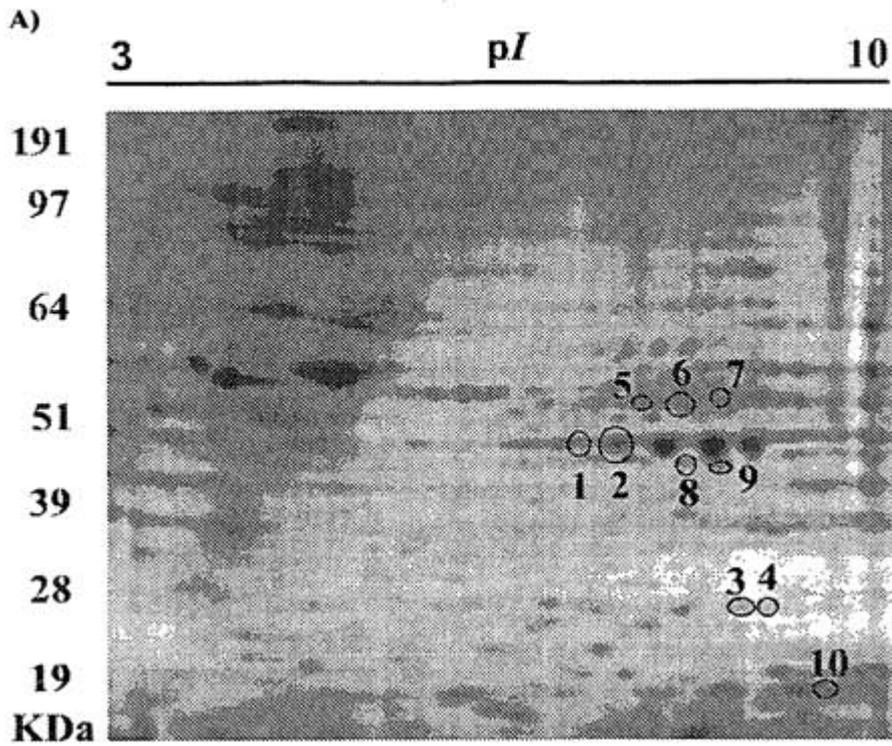


Figura 2



B)

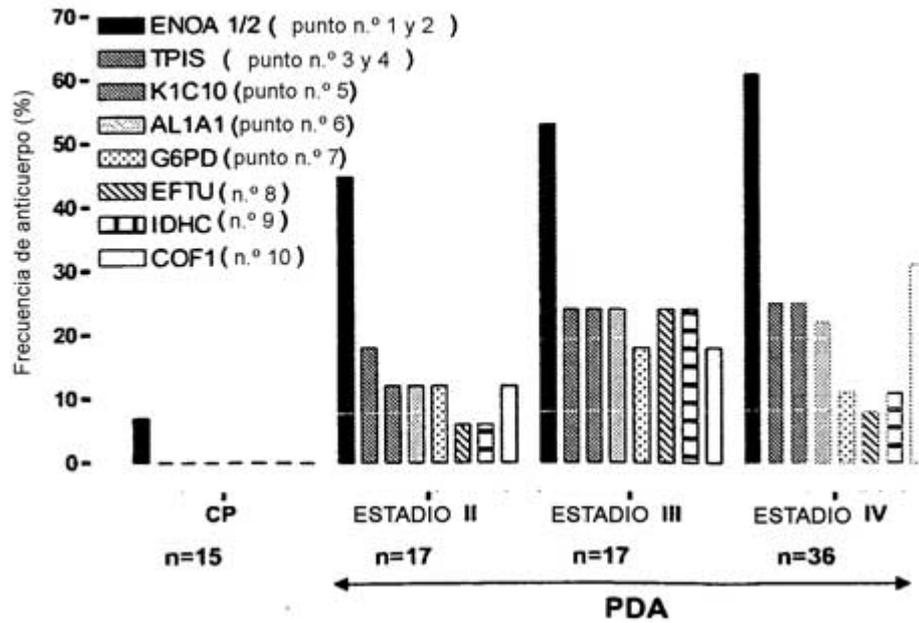


Figura 4

ENOA	MSILKIHAREIFD	SRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDK	TRYMGK				
		n g g k p g gk n p n	p n				
		g p k p p p g d	(i) g d				
		k p p	k				
		p	p				
			(r)				
			p				
			(m)				
			(i)				
ENOA	GVS	KAVEHINKT	TIAPALVSKKLNVT	EQEKIDKLM	EMDGTENKSK	FGANAILGVS	SLAVCK
	(m)	k	k	g	g	g	g
	k	p	p	k	p	k	k
	p		p	p		p	p
ENOA	AGAVEKGVPLYR	HIADLAGNSEVILPVP	AFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILP	VGAANFRE			
		p	p	g			
			k				
			p				
ENOA	AMRIGAEVYHNLK	NVIK	KEKYGK	DATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLK	TAIGKAGYTDK		
	n	n	p	g	nn		
	g	g		p	gg		
	p	k			pk		
		(i)			(ii)		
		p			p		
ENOA	VIGMDVAASEFFR	SGKYDLDFKSPDDPSR	YISPDQ	LADLYKSF	IKDY	VPVVSIEDPFDQDD	
	g	n (i)	n	n n n	g g	n	
	p	p p	g	p g g	p p	(r) g	
			p	d d	p	p	
				k k			
				p p			
ENOA	WGAWQKFTAS	AGIQVVGDDLTV	TNPKRIAKAVNEK	SCNCLLLKVNQIGSV	TESLQACKLA		
	g k	g g	g	n g g			
	p p	k k	p	g p k			
		p p		k p			
				p			
ENOA	QANGWGMVSHRS	GETEDTFIADLVVGLCTG	QIKTGAPCRSERLAKYNQLLR	IEEELGSK			
	g	n g g	p	g	g		
	p	g p p		p	p		
		p			(i)		
ENOA	AKFAGRNF	RNPLAK					

n NetPhos
g GPS
d dbPTM
k NetPhosk
p PSPP

(m) Identificado en Molina H et al., 2007
(r) Identificado en Rush at al., 2005
(i) Identificado en la isoforma 3 de ENOA aislada de extractos celulares de CF-PAC-1 mediante 2-DE

Figura 5

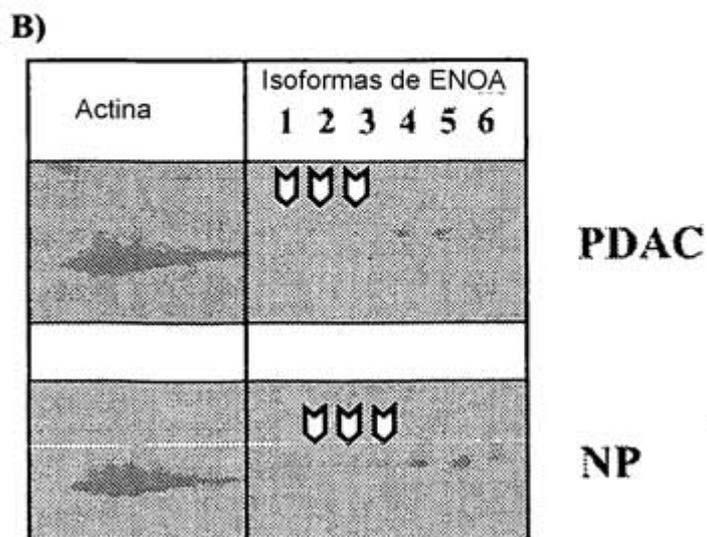
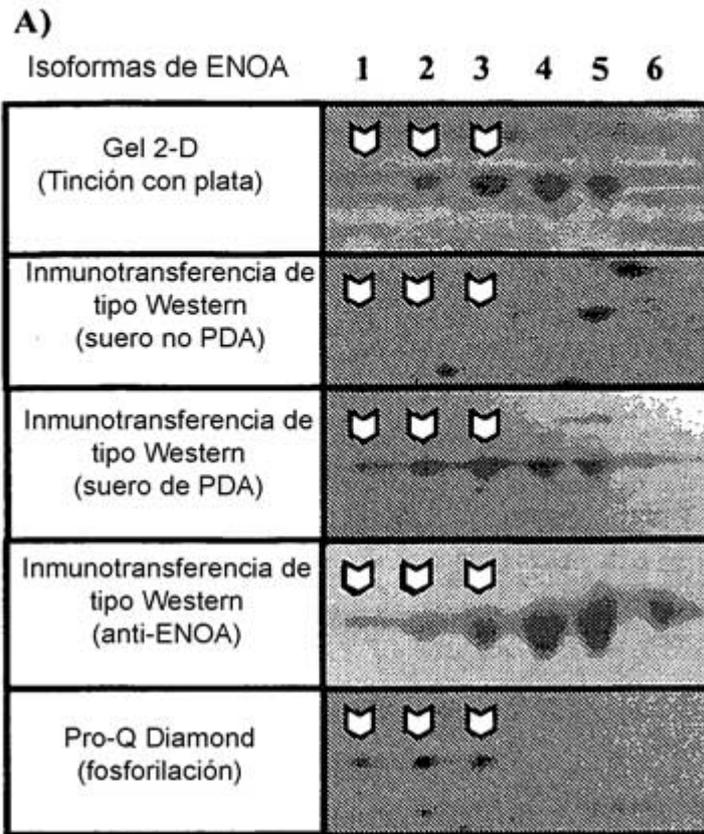


Figura 6

