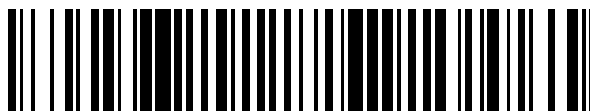


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 058**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/26** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2005** **E 05784499 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013** **EP 1794586**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales para progastrina**

30 Prioridad:

**22.09.2004 US 612224 P**

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

**05.04.2013**

73 Titular/es:

**CANCER ADVANCES, INC. (100.0%)  
4364 SOUTH ALSTON AVENUE  
DURHAM NC, US**

72 Inventor/es:

**GRIMES, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 400 058 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

Anticuerpos monoclonales para progastrina

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra regiones específicas del precursor de la hormona gastrina, progastrina, hallado *in vivo* en un animal, en particular un ser humano. La invención se refiere además a la aplicación de estos anticuerpos monoclonales (mAb) para detección, diagnóstico y supervisión de enfermedades y afecciones promovidas por gastrina, y a procedimientos de uso de los mAb de la invención para la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones promovidas por gastrina. La invención también se refiere a moléculas sustitutas y su uso como patrones de referencia en inmunoensayos, particularmente como se aplican a hormonas peptídicas.

15 **Antecedentes de la invención**

La preprogastrina humana, un péptido de 101 aminoácidos, es el producto de traducción primario del gen de gastrina y tiene la siguiente estructura:

20 MQRLCVYVLIFALALAAFSE ASWKPRSQQP DAPLGTGANR DLELPWLEQQ GPASHHRRQL GPQGPPHLVA  
DPSKKQGPWL EEEEEAYGWM DFGRRSAEDE N (SEC ID N°: 1).

La progastrina se forma por escisión de los primeros 21 aminoácidos (que constituyen el péptido señal) de preprogastrina. La cadena de 80 aminoácidos de longitud de progastrina se procesa adicionalmente por escisión y enzimas de modificación a varias formas de hormona gastrina biológicamente activas, incluyendo gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) y gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly).

La G17 madura está modificada en los restos tanto amino como carboxilo terminales: la glutamina N terminal ciclada para formar ácido piroglutámico (pGlu) y el grupo carboxilo libre del resto de fenilalanina C terminal está amidado por la enzima, monooxigenasa amidante de peptidil  $\alpha$  (PAM) para formar un Phe-NH<sub>2</sub> C terminal. La G34 madura está amidada de forma idéntica en su extremo C terminal para formar un Phe-NH<sub>2</sub> C terminal. (Véase Dockray *et al.*, Ann. Rev. Physiol. (2001) 63: 119-139).

La G17 madura, la forma predominante de la gastrina "pequeña" en seres humanos, tiene la secuencia de aminoácidos: pEGP-WLEEEEEAYGWMDF-NH<sub>2</sub> (SEC ID N°: 2). G17-Gly es una forma procesada de forma incompleta de gastrina hallada como un componente menor de gastrina "pequeña" en sujetos humanos sanos y tiene la secuencia de aminoácidos: pEGPWLEEEEEAYGWMDFG (SEC ID N°: 3).

La gastrina 34, la forma predominante de gastrina "grande" en seres humanos, tiene la secuencia de aminoácidos: pELGPQGPPHL VADPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDF-NH<sub>2</sub> (SEC ID N°: 4). La gastrina 34 extendida con glicina (G34-Gly) tiene un resto de glicina C terminal y tiene la secuencia de aminoácidos: pELGPQGPPHLVADPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDFG (SEC ID N°: 5).

La gastrina se secreta por las células G antrales pilóricas del estómago en respuesta a péptido liberador de gastrina (GRP), y se suprime por ácido gástrico y la acción paracrina de varias hormonas peptídicas, más notablemente, somatostatina. Se ha reconocido durante mucho tiempo que los péptidos de gastrina actúan para estimular la secreción de ácido en el estómago de individuos sanos, sin embargo, se ha mostrado solo recientemente que estos péptidos también controlan la proliferación, diferenciación y maduración de diferentes tipos celulares en el sistema gastrointestinal (GI).

La progastrina normalmente se procesa completamente a formas de hormona gastrina. Cuando se produce en exceso, la progastrina se procesa al menos parcialmente en una o más formas de hormona gastrina que actúan en el sistema gastrointestinal y pueden potenciar la formación de tumores promovidos por gastrina. En algunos casos la progastrina circula en sangre y puede detectarse en la orina de pacientes que padecen enfermedades o afecciones promovidas por progastrina.

Además de su actividad local en el sistema GI, G17 y, en menor grado, G17-Gly se liberan al torrente sanguíneo y se ha descubierto que aumentan en el suero de pacientes aquejados de trastornos y enfermedades gastrointestinales, tales como cáncer gástrico, cáncer colorrectal y cáncer pancreático. También se ha descubierto recientemente que estas especies de gastrina están asociadas con otras enfermedades no asociadas con el tracto gastrointestinal, incluyendo cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC) y tumores metastatizados de hígado. Véase por ejemplo "Gastrin and Colon Cancer: a unifying hypothesis" S. N. Joshi *et al.*, Digestive Diseases (1996) 14: 334-344; y "Gastrin and Colorectal Cancer" Smith, A. M. and Watson, S.A. (2000) Alimentary Pharmacology and Therapeutics 14(10): 1231-1247.

65

Los anticuerpos son reactivos clave en numerosas técnicas de ensayo usadas en los campos médico, veterinario y otros de inmunodetección. Tales ensayos incluyen muchas técnicas de inmunoensayo usadas habitualmente, tales como por ejemplo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia (IF).

5 Jonsson y Dockray, *Regulatory Peptides*, 8 (1984), pp. 283- 290, desvelan anticuerpos policlonales contra fragmentos N terminales de progastrina porcina.

10 Se ha mostrado que los anticuerpos policlonales antigastrina son eficaces en la inhibición de la actividad de gastrina ("Inhibition of gastrin activity by incubation with antibodies to the C-terminal tetrapeptide of gastrin" Jaffe *et al.*, *Surgery* (1969) 65(4): 633-639); y se han aplicado anticuerpos policlonales antigastrina no humanos a terapia en un paciente que padece síndrome de Zollinger-Ellison, una afección patológica en la que se produce gastrina en exceso sin estimulación por alimentación. Véase Hughes *et al.*, "Therapy with Gastrin Antibody in the Zollinger-Ellison Syndrome" Hughes *et al.*, *Digestive Diseases* (1976) 21(3): 201-204. Sin embargo, estos anticuerpos antigastrina de conejo tuvieron, "en el mejor de los casos un efecto a corto plazo en este paciente" (Hughes en p. 204). Las patentes de Estados Unidos 5.886.128 y 5.785.970 describen métodos de tratamiento de úlceras o tumores cuyo crecimiento depende de o está estimulado por hormonas gastrina inmunizando con conjugados peptídicos de hormona gastrina.

20 Hasta ahora, no han estado disponibles mAb capaces de detectar de forma sensible y distinguir de forma precisa progastrina de las formas procesadas de la hormona gastrina. Además, hasta la presente invención, no fue posible medir de forma precisa la cantidad de progastrina en una muestra, tal como por ejemplo una muestra de fluido biológico. Los mAb de la invención pueden usarse en ensayos para pruebas clínicas para definir de forma precisa la biología de la progastrina en estados normales y patológicos. La invención también proporciona composiciones de mAb para uso farmacéutico y métodos para la prevención y tratamiento de enfermedades y afecciones promovidas por progastrina.

### Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal de unión a progastrina que se une selectivamente a progastrina, en el que la molécula no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34(G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly) como se define en las reivindicaciones. La molécula de unión a progastrina es una molécula de anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, una región de unión a anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.

35 La invención proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 1-9 de progastrina, es decir SWKPRSQQP (SEC ID N°: 6). También se proporcionan hibridomas que producen los mAb que se unen selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 1-9 de progastrina, es decir SWKPRSQQP (SEC ID N°: 6).

40 La presente invención proporciona un mAb que se une selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 6-14, es decir SQQPDAPLG (SEC ID N°: 7). También se proporcionan hibridomas que producen mAb que se unen selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 6-14, SQQPDAPLG (SEC ID N°: 7).

45 En otro aspecto más, la presente descripción proporciona un mAb que se une selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 72-80 de progastrina, GRRSAEDEN (SEC ID N°: 8). También se proporcionan hibridomas que producen mAb que se unen selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 72-80, GRRSAEDEN (SEC ID N°: 8).

50 De acuerdo con la presente invención, pueden usarse combinaciones de dos o más de la progastrina, en la que la molécula no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly) en un panel de moléculas de unión a progastrina.

55 También se proporcionan composiciones farmacéuticas de una molécula de unión a progastrina, en las que la molécula no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly), o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto particular, la invención proporciona composiciones farmacéuticas de un mAb que se une selectivamente a: (1) progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1-9 de progastrina, SWKPRSQQP (SEC ID N°: 6); o (2) progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 6-14, SQQPDAPLG (SEC ID N°: 7); en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 La presente invención proporciona además un inmunoensayo de progastrina. El método incluye: en primer lugar, obtener una muestra para ensayar con respecto a progastrina y poner en contacto la muestra con una molécula de unión a progastrina que no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly), en condiciones estables para unión y permitir que cualquier progastrina presente forme un complejo de molécula de unión progastrina-progastrina; detectar después la

presencia o ausencia del complejo de molécula de unión progastrina-progastrina; y/o determinar la cantidad de un complejo de molécula de unión progastrina-progastrina en la muestra por un método de inmunoensayo.

5 La presente invención proporciona además métodos para diagnosticar una enfermedad o afección promovida por gastrina en un paciente determinando el nivel de progastrina en una muestra de un fluido biológico del paciente comparando el nivel de progastrina en la muestra con el nivel de progastrina en una muestra de fluido biológico de uno o más individuos control o con un patrón de referencia. Tales enfermedades o afecciones promovidas por gastrina pueden prevenirse o tratarse administrando a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que incluya una molécula de unión a progastrina que se une selectivamente a: (1) progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 1-9 de progastrina, SWKPRSQQP (SEC ID N°: 6); o (2) progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 6-14 de progastrina, SQQPDAPLG (SEC ID N°: 7).

15 También se proporciona un método para supervisar una enfermedad o afección promovida por gastrina en un paciente. El método incluye determinar el nivel de progastrina en una muestra de un fluido biológico de un paciente que padece o está en riesgo de una enfermedad o afección promovida por gastrina en un primer punto temporal; determinar el nivel de progastrina en una o más muestras del fluido biológico del paciente en uno o más puntos temporales diferentes; comparar los niveles de progastrina determinados en diferentes puntos temporales y de este modo supervisar la enfermedad o afección promovida por gastrina.

20 La invención proporciona además un kit para realizar un inmunoensayo, que incluye una molécula de unión antiprogastrina y un recipiente adecuado. La molécula de unión a progastrina se une selectivamente a progastrina, pero no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly).

25 También se describe una molécula de patrón de referencia sustituto (SRS) que consiste esencialmente en una cadena peptídica de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 aminoácidos. La molécula de SRS incluye inmunomiméticos de al menos dos epítipos hallados en una proteína de interés de más de aproximadamente 50 aminoácidos.

30 La descripción también proporciona además un método para normalizar un inmunoensayo de tipo sándwich para una proteína de interés de más de aproximadamente 50 aminoácidos que comprende un primer y un segundo epítipo, comprendiendo el método detectar o medir una señal generada en el inmunoensayo con una cantidad convencional de una molécula de patrón de referencia sustituto (SRS). La molécula SRS consiste esencialmente en una cadena peptídica de entre 10 y aproximadamente 35 aminoácidos que incluye inmunomiméticos del primer y segundo epítipos de la proteína de interés.

#### **Descripción detallada de la invención**

40 Lo siguiente proporciona las definiciones de términos y frases como se usan en la presente memoria descriptiva.

Como se usa en este documento, "preprogastrina" es el producto de traducción primario de 101 aminoácidos del gen de gastrina e incluye la secuencia señal N terminal de 21 aminoácidos, las secuencias propeptídicas y las secuencias de hormona gastrina.

45 Como se usa en este documento, "Progastrina" es el producto de 80 aminoácidos formado después de la escisión de la secuencia señal de 21 aminoácidos de la preprogastrina. La "progastrina" es el precursor primario de todas las formas biológicamente activas de la hormona gastrina.

50 Como se usa en este documento un "inmunomimético de progastrina" es un resto que induce anticuerpos que se unen a progastrina y se unen a anticuerpos antiprogastrina. Como se usa en este documento, los restos inmunomiméticos de progastrina no se unen a gastrina-17 (G17), bien amidada en el extremo C terminal o que tenga un extremo C terminal libre; gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly); gastrina-34 (G34) incluyendo tanto la forma amidada en el extremo C terminal como la forma que tiene un extremo C terminal libre; o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly).

60 Como se usa en este documento, una "hormona gastrina" o una "forma de hormona gastrina" se usan de forma intercambiable y significan cualquier péptido de hormona gastrina biológicamente activo y/o de reacción cruzada inmunológica. Las principales formas de la hormona gastrina incluyen, pero sin limitación, gastrina-17 (G17), bien amidada en el extremo C terminal o que tenga un extremo C terminal libre; gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly); gastrina-34 (G34) que incluye tanto la forma amidada en el extremo C terminal como la forma que tiene un extremo C terminal libre; gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly).

65 Un "fluido biológico" como se usa en este documento significa cualquier fluido que incluya material de origen biológico. Los fluidos biológicos preferidos para su uso en la presente invención incluyen fluidos corporales de un animal, por ejemplo un mamífero, preferentemente un sujeto humano. El fluido corporal puede ser cualquier fluido

corporal, incluyendo pero sin limitación sangre, plasma, suero, linfa, líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, sudor y orina.

5 Un “agente conservante” como se usa en este documento significa cualquier agente, complemento o aditivo que reduzca la degradación dependiente del tiempo de gastrina en una muestra de fluido biológico, o una muestra líquida que comprenda un componente biológico. Los agentes conservantes útiles en la práctica de la presente invención incluyen cualquiera de los muchos agentes conservantes bien conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación conservantes líquidos generales, tales como por ejemplo, azida sódica, EDTA e inhibidores de proteasa, 10 tales como por ejemplo, PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro), y aprotinina (por ejemplo Trasylol), o un conservante biológico, tal como por ejemplo, heparina.

15 Una “molécula de unión a progastrina” como se usa en este documento puede ser cualquier molécula que se una a progastrina, pero no se una a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly).

20 Una “enfermedad o afección promovida por gastrina” como se usa en este documento significa cualquier enfermedad o afección en la que la gastrina y/o progastrina tenga un papel estimulador. Por ejemplo, se sabe bien que la gastrina estimula el crecimiento y proliferación de muchas formas de tumores, particularmente tumores gastrointestinales, tales como tumores colorrectales. Véase documento U.S. 6.548.066 de Michaeli *et al.*

25 Las moléculas de anticuerpo antiprogastrina pueden ser moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, o fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab, o cualquier otro fragmento de anticuerpo que incluya una región de unión a progastrina. Preferentemente, las moléculas de anticuerpo monoclonal antiprogastrina de la invención son moléculas de anticuerpo de mamífero, tales como moléculas de anticuerpo de conejo, ratón o ser humano. Las moléculas de anticuerpo antiprogastrina de la invención pueden ser anticuerpos humanos/no humanos quiméricos (por ejemplo quimeras humano/ratón), anticuerpos humanizados o completamente humanos.

30 Los anticuerpos monoclonales (mAb) tienen características únicas que los hacen superiores en muchos aspectos a antisueros policlonales y anticuerpos purificados de antisueros policlonales cuando se usan en muchos de estos ensayos. Estos atributos incluyen especificidad monodeterminante para el antígeno diana (es decir especificidad para un epítipo sencillo), especificidad no cambiante entre diferentes preparaciones de anticuerpo, así como afinidad no cambiante y composición química a lo largo del tiempo. Además, pueden producirse mAb de forma indefinida y en cantidades ilimitadas por métodos *in vitro*. Estas propiedades están en claro contraste con las de los anticuerpos policlonales, que requieren métodos de inmunización *in vivo* con la inevitable variabilidad biológica asociada y capacidad de producción de anticuerpo limitada durante el ciclo de vida del animal inmunizado. 35

A pesar de estas ventajas, existen diferencias entre mAb individuales aunque pueden ser específicos para el mismo epítipo. Por ejemplo, pueden surgir diferencias entre mAb inducidos por inmunización con una región epitópica antigénica única con respecto a cualquiera o todas de las siguientes características: 1) la especificidad fina para la composición molecular y estructura terciaria del epítipo; 2) el idiotipo del anticuerpo; 3) la afinidad del anticuerpo; 4) el alotipo del anticuerpo; y 5) el isotipo del anticuerpo. Estas diferencias características pueden afectar al comportamiento de los mAb en un inmunoensayo particular, de modo que diferentes aislados de mAb inducidos contra la misma región antigénica pueden comportarse de forma diferente en un ensayo dado. En consecuencia, algunos mAb serán superiores a otros que se unen al mismo epítipo cuando se usan como reactivos en un inmunoensayo particular. 45

Las moléculas de unión antiprogastrina de la presente invención, especialmente los mAb antiprogastrina, son particularmente útiles en un inmunoensayo. El inmunoensayo puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunodifusión o un ensayo de inmunodetección, tal como un ensayo de resistencia de plasmón superficial (por ejemplo un ensayo Biacore®), un ELISPOT, transferencia por ranuras o una transferencia de western. Como guía general para tales técnicas, véase por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds) (1987) en “Current Protocols in Molecular Biology” John Wiley and Sons, Nueva York, N. Y. 50

55 En una realización particularmente útil las moléculas de unión a progastrina de la presente invención pueden usarse en un inmunoensayo tal como un ensayo de tinción inmunohistoquímica (IHC) o un procedimiento de inmunofluorescencia (IF) para visualización de una forma de hormona gastrina en una muestra tisular. Véase por ejemplo “Principles and Practice of Immunoassay” (1991) Christopher P. Price y David J. Neoman (eds), Stockton Press, Nueva York, N. Y.

60 La tinción inmunohistoquímica es de gran valor en la detección y diagnóstico de tumores, véase por ejemplo, Bodey, B. “The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms” (2002) *Expert Opin Biol Ther.* 2(4): 371-93. Véase también Osin PP, Lakhani SR. (1999) *The Pathology of Familial Breast Cancer: Immunohistochemistry and Molecular Analysis.* *Breast Cancer Res.* 1(1): 36-40.

65 Anticuerpos monoclonales antiprogastrina

La selección del anticuerpo monoclonal (mAb) óptimo para su uso en una aplicación particular se consigue preferentemente evaluando el rendimiento de cada uno de los mAb candidatos individuales en la aplicación pretendida particular. Por esta razón, los ensayos de mAb candidatos con respecto a funcionalidad óptima en la aplicación pretendida son parte del proceso selectivo para derivar un mAb que sea óptimo para el uso pretendido.

5 Esta etapa selectiva se realiza además de las etapas de selección normalmente realizadas en la derivación de mAb, que incluyen unión con el antígeno diana y clonación en serie del hibridoma que produce el mAb para asegurar la estabilidad de las características esenciales de la línea celular de hibridoma, incluyendo crecimiento y división celular persistente, y producción de anticuerpos ilimitada uniforme durante un periodo indefinido.

10 Como se usa en este documento, un anticuerpo que es "selectivo" para un epítipo diana particular de progastrina significa que el anticuerpo se une al epítipo diana particular de progastrina con una  $K_a$  de al menos aproximadamente diez veces más que cualquier otro epítipo de gastrina, preferentemente cien veces más que cualquier otro epítipo de gastrina, y más preferentemente al menos aproximadamente mil veces más que cualquier otro epítipo de gastrina.

15 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar mAb selectivos para el extremo N terminal y C terminal de progastrina, teniendo los mAb propiedades superiores. Estos mAb son particularmente adecuados para su uso en un ensayo inmunoenzimométrico (denominado habitualmente un "ELISA" o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) diseñado para medir la forma particular de hormona gastrina en un fluido, especialmente en un fluido biológico.

20

Los mAb de la presente invención también son adecuados para detectar y/o cuantificar la hormona gastrina en ensayos de inmunodetección, tales como por ejemplo, ELISPOT, radioinmunoensayo, ensayo de captura de tipo sándwich basados en anticuerpos, sistemas detectores de resistencia de plasmón superficial (tales como sistemas de tipo Biacore<sup>®</sup>), ensayos de transferencia puntual, transferencia por ranuras y transferencia de western, así como ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímicos.

25

En otro aspecto, la presente invención proporciona mAb que se unen selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 1-9 de progastrina (SWKPRSQQP, SEC ID N°: 6), es decir el producto formado después de escisión de la secuencia señal de veintidós aminoácidos de preprogastrina (el producto de traducción primario del gen de gastrina).

30

En otro aspecto más, la presente invención proporciona mAb que se unen selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 6-14 de progastrina (SQQPDAPLG, SEC ID N°: 7), es decir el producto formado después de la escisión de la secuencia señal de veintidós aminoácidos de preprogastrina (el producto de traducción primario del gen de gastrina) seguido de la retirada adicional de los aminoácidos 1-5 de progastrina.

35

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona mAb que se unen selectivamente a progastrina en un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos 72-80 de la región C terminal de progastrina (GRRSAEDEN, SEC ID N°: 8) es decir el producto formado después de escisión de la secuencia señal de veintidós aminoácidos de preprogastrina (el producto de traducción primario del gen de gastrina).

40

En un aspecto adicional más, la invención proporciona mAb que se unen de forma selectiva a progastrina. Estos mAb se unen a progastrina, pero no se unen a las formas de hormona gastrina procesadas: G17, G34, G17-Gly o G34-Gly. Estos mAb que se unen a la región C terminal de la progastrina humana también se unen a preprogastrina, que consiste en una cadena peptídica de 101 aminoácidos de la que se procesan secuencialmente progastrina y gastrina. Sin embargo, el procesamiento de preprogastrina es rápido y sucede en un retículo endoplásmico (RE) en el que se sintetiza. Los mAb de la invención que se unen a progastrina son útiles en ensayos que se ha descrito en este documento que detectan y cuantifican la progastrina en una muestra.

45

50

Los mAb de la presente invención pueden quimerizarse o humanizarse de acuerdo con técnicas establecidas bien conocidas en este campo. Véase por ejemplo, patente de Estados Unidos 4.816.567 de Cabilly titulada "Preparaciones de inmunoglobulina recombinante" y la patente de Estados Unidos 6.689.869 titulada "Anticuerpos anti CD-18 humanizados marcados y fragmentos y kits" de Waldman *et al.*, y patente de Estados Unidos 6.639.055 titulada "Método para realizar anticuerpos humanizados" de Carter *et al.* El anticuerpo humanizado puede remodelarse para coincidir de forma más estrecha con la afinidad de unión del mAb de ratón original. Véase por ejemplo, patente de Estados Unidos 6.699.974 titulada "Anticuerpo anti HM1.24 humano remodelado" de Ono *et al.*

55

La presente invención también proporciona métodos para detección de muestras de progastrina, especialmente de muestras biológicas tales como fluidos biológicos y células, tejidos, muestras de biopsia y secciones de órganos, etc. La invención proporciona además métodos de diagnóstico de una enfermedad o afección promovida por gastrina en un paciente determinando la presencia de progastrina en tejido y células enfermos o normales. Los métodos incluyen determinar el nivel de progastrina en una muestra de un fluido biológico del paciente y comparar el nivel de progastrina en la muestra del paciente con el nivel de progastrina en una muestra de fluido biológico de uno o más individuos de control. La muestra de los individuos de control puede ser un fluido biológico recogido de individuos

60

65

sanos. Como alternativa, el nivel de progastina en la muestra del paciente puede compararse con un patrón de referencia. El patrón de referencia puede ser un patrón calibrado para estar dentro del intervalo normal para progastina en individuos sanos. El patrón de referencia puede ser un patrón calibrado para estar dentro del intervalo normal para progastina en individuos sanos. Tales muestras de control pueden prepararse fácilmente por los expertos en la materia sin experimentación indebida. Véase también posteriormente Patrones de Referencia Sustitutos.

Estos métodos de detección y diagnóstico pueden conseguirse por medio de tinción inmunohistoquímica de muestras de ensayo de biopsia usando un mAb antiprogastrina de la invención. La unión de mAb antiprogastrina con muestras tisulares puede visualizarse por métodos inmunohistoquímicos, tales como, por ejemplo, por fluorescencia, inmunoro o tinción promovida por enzima. Para una revisión general de inmunohistoquímica en procedimientos de diagnóstico véase por ejemplo, Miller *et al.*, Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: a concise review with practical considerations. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. (2000) 8(3): 228-235.

Por dichos métodos, un experto en la materia puede utilizar los mAb antiprogastrina de la presente invención para evaluar tejidos, incluyendo tejido enfermo, canceroso o precanceroso, con respecto a la presencia y distribución de progastina. Esta información puede ser útil para diagnóstico y también puede ser práctica para la selección de tratamientos apropiados para las enfermedades y afecciones promovidas por gastrina o promovidas por progastina diagnosticadas.

#### Patrones de referencia sustitutos

Los ensayos basados en anticuerpos para un antígeno en el que se detecta o mide el antígeno en un sistema de ensayo que se basa en la unión de anticuerpos dirigidos contra dos epítos separados expresados por el antígeno, pueden limitarse en la utilidad práctica en ciertas circunstancias. Este es el caso cuando el antígeno de referencia para el ensayo, contra el que se cuantifica antígeno en muestras de ensayo, no pueda obtenerse o sintetizarse fácilmente. Por ejemplo, en el ELISA de tipo sándwich de progastina descrito en la presente solicitud, se genera una curva patrón usando diluciones en serie de una solución de antígeno de referencia a una concentración conocida.

Por lo tanto, el ensayo para cuantificar progastina puede procesarse para establecer una curva patrón usando una serie de diluciones de progastina. Esta curva patrón de la concentración de progastina contra la señal producida permite la cuantificación de progastina en muestras de ensayo por comparación de la señal obtenida con la muestra de ensayo y lectura de la concentración de progastina a partir de la curva patrón. La limitación de este procedimiento es que algunos de los antígenos pueden ser difíciles, o excesivamente costosos, de obtener en forma pura y en suficiente cantidad para producir un ensayo práctico para su uso clínico. Por ejemplo, la progastina purificada (una prohormona de 80 aminoácidos) es costosa de producir y difícil de sintetizar de forma precisa. Estas restricciones limitarían gravemente la utilidad del ELISA de captura para progastina, que se basa en anticuerpos que se unen a los dos extremos terminales de la molécula.

Una solución a este problema es sustituir con un Patrón de Referencia Sustituto (SRS) la molécula nativa. El SRS contiene ambos epítos expresados por la molécula nativa que se requieren para el inmunoensayo, permitiendo que los anticuerpos tanto de captura como de detección se unan al SRS. Sin embargo, la región intermedia (y/o las regiones desde cada epítoto al extremo) de la molécula nativa se elimina, se reemplaza o se acorta en el SRS, de modo que el SRS es significativamente más corto que la molécula nativa y por lo tanto puede sintetizarse fácilmente a un coste razonable.

Los péptidos de hasta aproximadamente 35 aminoácidos de longitud pueden sintetizarse fácil y económicamente por métodos de síntesis peptídica existentes. Por lo tanto, es práctica la adición de un enlazador de uno hasta aproximadamente 20 aminoácidos que une los dos epítos del SRS. En realizaciones particulares, el enlazador puede ser de aproximadamente cuatro a aproximadamente quince aminoácidos de longitud, o de aproximadamente ocho a aproximadamente doce aminoácidos de longitud. Los enlazadores pueden diseñarse para potenciar el rendimiento de ensayo por selección de un enlazador de la longitud y carácter apropiados (tales como rigidez o flexibilidad, hidrofilia o hidrofobicidad, y similares) para rendimiento óptimo en el inmunoensayo particular en el que el SRS debe actuar como un patrón de referencia.

El concepto de patrón de referencia sustituto se puede aplicar ampliamente a ensayos en los que un compuesto sintético más sencillo puede actuar como un sustituto de un compuesto natural más complicado. Por lo tanto, en el caso de los ELISA de tipo sándwich en los que el antígeno se captura por un anticuerpo de una especificidad y se detecta por un anticuerpo de una segunda especificidad, el SRS tiene la estructura general:

[X-epítoto 1-L-epítoto 2-Y]

En la que el epítoto 1 y el epítoto 2 son inmunomiméticos de diferentes epítos de la molécula nativa, de modo que los anticuerpos que se unen al epítoto 1 o epítoto 2 también se unen al epítoto correspondiente de la molécula nativa. La molécula de SRS es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 35 aminoácidos de longitud. El epítoto 1 y epítoto 2 se unen por un enlazador, L que puede ser un enlazador peptídico o no peptídico, o L puede

ser un enlace covalente. X y Y pueden ser cada uno un aminoácido, una secuencia peptídica o un grupo de bloqueo. Como alternativa, bien X o bien Y, o ambos pueden ser un átomo de hidrógeno del extremo N terminal o el extremo C terminal, respectivamente, del SRS.

- 5 Los enlazadores útiles en la práctica de la presente invención incluyen cualquier resto enlazador. Tales restos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los restos enlazadores peptídicos útiles incluyen gly-gly, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.759.551, expedida a Ladd *et al.*, col. 9, línea 64; los péptidos inactivos de la Patente de Estados Unidos N° 6.613.530, expedida a Wienhues *et al.*, col. 3, líneas 38-47; y los espaciadores bisagra flexibles ricos en prolina descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.683.695, expedida a Shen *et al.*
- 10 Además, también son útiles restos espaciadores no peptídicos y tienen la característica añadida de que son generalmente resistentes a proteasa. Tales restos incluyen, por ejemplo, -O-R-CO-, NH-R-CO-, -NH-R-NH-, -O-R-NH-, o -NH-R-CH<sub>2</sub>-, en los que R es una cadena de hidrocarburo saturada o insaturada opcionalmente sustituida y/o interrumpida por uno o más radicales aromáticos o heteroátomos, por ejemplo un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.736.146 y 5.869.058,
- 15 ambas expedidas a Cohen *et al.* Los enlazadores químicos no peptídicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.780.969 de Wang también son útiles en la práctica de la presente invención.

La progastrina es un péptido grande de 80 aminoácidos que es difícil y caro de purificar en cantidad. Un SRS consistente en el epítipo N terminal de progastrina (por ejemplo aminoácidos de progastrina 1-9), opcionalmente seguido de un enlazador corto, unido a un epítipo C terminal de progastrina (por ejemplo los aminoácidos 72-80) puede sintetizarse por métodos rutinarios, tales como por síntesis peptídica de fase sólida. El enlazador puede ser cualquier enlazador, tal como por ejemplo un aminoácido, un enlazador peptídico o uno no peptídico. El SRS es útil para normalizar un inmunoensayo de progastrina.

20

25 En una realización particular, el SRS de Progastrina incluye péptidos que contienen dos epítipos de 9 aminoácidos cada uno, opcionalmente conectados por una secuencia enlazadora entre los dos péptidos. Las secuencias peptídicas que contienen epítipo de longitud más corta o más larga pueden sustituirse, siempre que la longitud total de SRS no exceda aproximadamente treinta y cinco restos de aminoácidos de longitud y que se conserve suficiente unión de los anticuerpos con sus epítipos afines respectivos para el rendimiento adecuado del ensayo.

30

Si se incluye un enlazador peptídico entre los dos epítipos de progastrina como se ha descrito anteriormente, la longitud del péptido SRS de Progastrina aumenta por la longitud del enlazador. Por ejemplo, un enlazador de -Pro-Pro- o de -Gly-Gly- aumenta la longitud total del péptido de 18 a 20 aminoácidos. Pueden sustituirse enlazadores de aminoácidos más largos; seleccionándose la secuencia óptima para su uso como el SRS de Progastrina. En una realización preferida el enlazador es un péptido que incluye combinaciones de Prolina y Glicina, tales como, por ejemplo, -Pro-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro- (SEC ID N°: 9). Tales péptidos de hasta 35 aminoácidos de longitud pueden sintetizarse fácilmente en grandes cantidades a un nivel alto de pureza a coste razonable por métodos convencionales. Véase por ejemplo Merrifield, *Methods in Enzymology* (1997), 289: 3-13; También, Wade y Tragear, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Australas. Biotechnol. (1993) 3(6): 332-6.

35

40 El SRS de Progastrina puede usarse en lugar de un patrón de referencia de progastrina auténtico como sigue. Se prepararía una solución de SRS de progastrina en la misma concentración molar de péptido que se usaría si la progastrina fuera el patrón de referencia. Se prepara una dilución en serie de esta solución, después se usa en el ensayo para establecer la curva de referencia (concentración molar frente a señal por ejemplo absorbancia).

45

Pueden prepararse soluciones de SRS de progastrina en forma molar, proporcionando respuestas inmunométricas idénticas a las soluciones de progastrina en sí misma; se obtienen curvas patrón similares o idénticas con un SRS de progastrina que con progastrina auténtica. Después pueden compararse los valores de absorbancia obtenidos de muestras de ensayo reales, tales como plasma humano, que contienen progastrina, con la curva patrón de SRS, para determinar las concentraciones de progastrina en las muestras de ensayo. La comparación del patrón de SRS de progastrina contra un patrón de progastrina solo tiene que realizarse una vez y posteriormente solamente para comprobar la precisión.

50

Como alternativa, el SRS puede usarse para generar cualquier curva patrón arbitraria que no necesita calibrarse nunca frente a la molécula de patrón de referencia auténtica. Todos los resultados se expresan después como unidades arbitrarias basadas por comparación con una concentración de patrón conveniente de SRS.

55

El elemento enlazador puede requerirse o no, dependiendo de los atributos del SRS deseado en el método de ensayo particular en el que va a aplicarse. Los ejemplos de péptidos de SRS de progastrina adecuados para su uso en ELISA de progastrina incluyen:

60

[progastrina 1-9]-[progastrina 72-80] (SWKPRSQQPGRRSAEDEN, SEC ID N°: 10).

[progastrina 6-14]-[progastrina 72-80] (SQQPDAPLGGRRSAEDEN, SEC ID N°: 11).

[progastrina 1-9]-Gly-Gly-[progastrina 72-80] (SWKPRSQQPGGGRRSAEDEN, SEC ID N°: 12).

65



[progastrina 1-9]-Pro-[progastrina 72-80] (SWKPRSQQPPGRRSAEDEN, SEC ID N°: 13).

[progastrina 1-9]-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro-[progastrina 72-80] (SWKPRSQQPPGGPPGRRSAEDEN, SEC ID N°: 14).

[progastrina 6-14]-Pro-Pro-Gly-Gly-Pro-Pro-[progastrina 72-80] (SQPDAPLPGPPGGPPGRRSAEDEN, SEC ID N°: 15).

Pueden determinarse fácilmente secuencias potenciales adicionales de péptidos de SRS de progastrina sin experimentación indebida por un experto en la materia. El péptido de SRS de progastrina óptimo para cualquier inmunoensayo particular puede seleccionarse ensayando péptidos de SRS candidatos en el sistema de inmunoensayo y seleccionando un péptido de SRS que se asemeje a la progastrina auténtica en el intervalo de concentración de interés en las condiciones (por ejemplo de temperatura y fuerza iónica, y concentración de cationes divalentes etc.) del ensayo.

#### Paneles de monoclonales antiprogastrina

La presente descripción proporciona por primera vez paneles de mAb antiprogastrina y antigastrina que permiten la identificación inequívoca y cuantificación de progastrina y gastrina en una muestra. Los inmunoensayos rutinarios en los que pueden usarse los mAb de la invención incluyen, pero sin limitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de tipo resistencia de plasmón superficial (por ejemplo ensayos de tipo Biacore<sup>®</sup>), ensayos de inmunofluorescencia (IF), ensayos de inmunohistoquímica (IHC), ensayos de inmunodifusión y similares. Véase por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.932.412 titulada "Péptidos sintéticos en virus del papiloma humano 1, 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33 y 56 útiles en inmunoensayo para fines de diagnóstico" de Dillner *et al.* para ejemplos de métodos de ensayo de diagnóstico rutinarios.

La complementación del panel de mAb con uno o más mAb adicionales que se unen selectivamente a especies de hormona gastrina particulares proporciona la capacidad de identificación específica y cuantificación de más de una especie de hormona gastrina (producida por procesamiento de progastrina), además de la progastrina en una muestra. Por ejemplo, la adición de un mAb selectivo para el extremo N terminal de la forma G17 madura al panel de anticuerpos anteriormente descrito permite adicionalmente la identificación específica y cuantificación de hormona G17 madura en una muestra además de la identificación y cuantificación de progastrina por el mAb antiprogastrina de la presente invención. De forma similar, un panel de mAb que incluya un mAb antiprogastrina de la invención y también un mAb selectivo para el extremo N terminal de G34 también permite la identificación específica y cuantificación de G34 en una muestra. Por lo tanto, como se ha ilustrado anteriormente, la adición al panel de un mAb selectivo para cualquier forma de hormona gastrina particular puede usarse para proporcionar información adicional con respecto a la naturaleza y cantidades de la forma de hormona gastrina particular en la muestra además de la información relacionada con la progastrina obtenida con el mAb antiprogastrina de la invención.

Otras combinaciones de mAb útiles en un panel de mAb para identificación, cuantificación y supervisión de otras formas de hormona gastrina resultarán inmediatamente evidentes para los expertos en la materia. La presente invención abarca todos dichos pares de mAb de la invención y combinaciones de dos o más mAb de la invención.

Los mAb de la presente invención proporcionan el medio para determinar de forma precisa las cantidades y relaciones de formas de hormona gastrina/progastrina para evaluación de las predisposiciones a enfermedades y afecciones promovidas por hormona gastrina, y para detección y diagnóstico de tales enfermedades y afecciones en pacientes que las padezcan. Por ejemplo, los mAb antigastrina de la invención pueden incorporarse en ensayos de ELISA para exploración a gran escala de suero de pacientes u otro fluido biológico con respecto a progastrina y una cualquiera o todas las formas de hormona gastrina G17, G34 y la G17-Gly y G34-Gly.

Los mAb de la presente invención, las combinaciones de pares de mAb seleccionados de los mAb de la invención y paneles de mAb de la presente invención son particularmente útiles cuando se aplican a métodos de alto rendimiento. Tales métodos incluyen métodos de microplacas y micromatrices de detección de antígenos de hormona gastrina, de modo que puedan ensayarse muchas muestras en una microplaca o portaobjetos, u otro sustrato de ensayo, tal como una placa con pocillos virtuales (tal como por ejemplo, la descrita en la patente de Estados Unidos 6.565.813 de Garyantes *et al.*). La detección de unión puede ser por uno cualquiera de los muchos sistemas de detección del estado de la técnica disponibles actualmente. La detección de unión puede ser, por ejemplo, por cambios de la resistencia de plasmón superficial (SPR) provocados por reacciones biomoleculares específicas, tales como unión de antígeno-anticuerpo. Véase también, por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.981.167 de Taremi *et al.* para una aplicación de esta tecnología a ensayos enzimáticos. La tecnología puede aplicarse en un modo de flujo continuo y puede aplicarse igualmente a detección de unión de anticuerpo con un péptido o proteína inmovilizado en superficie, tal como una hormona gastrina o a la detección de un complejo gastrina-anticuerpo. Este último complejo puede detectarse por unión con un anticuerpo inmovilizado en superficie específico para un epítipo de la forma de hormona gastrina (G17, G34, G17-Gly o G34-Gly) cuya unión no está impedida de forma estérica por el anticuerpo del complejo. Además, esta tecnología tiene la ventaja de aplicabilidad de alto rendimiento y alta sensibilidad sin el requisito de un radiomarcador.

Los mAb de la presente invención también son útiles para ensayos de inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia (IF) de muestras tisulares, tales como por ejemplo, de material de biopsia. Tales análisis pueden usarse para detectar niveles aberrantes de formas de hormona gastrina individuales y por lo tanto para diagnosticar enfermedades y afecciones promovidas por hormona gastrina.

5 Los mAb de la presente invención también son útiles para prevención, diagnóstico y terapia de enfermedades y afecciones promovidas por hormona progastina. Los mAb antiprogastrina de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas para inmunización pasiva frente a formas de hormona gastrina particulares. Véase por ejemplo, patente de Estados Unidos 6.391.299 (en lo sucesivo en este documento la patente 299) titulada  
 10 "Anticuerpos anti factor IX/IXa" de Blackburn *et al.* También pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas fragmentos funcionales de los mAb de la presente invención, tales como, por ejemplo fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y cualquier fragmento (véase la patente 299 para descripciones de fragmento) que conserve la capacidad para unirse a la forma de hormona gastrina a la que se dirijan, y aplicarse en terapia. Véase la patente 299 para composiciones farmacéuticas útiles. Las vías preferidas de administración de las composiciones farmacéuticas de la  
 15 invención incluyen vías parenterales de administración, tales como vía subcutánea, vía intramuscular y vía intravenosa. Adicionalmente, la vía oral puede usarse para terapia de ciertas enfermedades, particularmente enfermedades del tracto gastrointestinal, tales como enfermedades ulcerantes del esófago o estómago.

20 Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden suministrarse por vía intranasal. Tales composiciones farmacéuticas son particularmente útiles cuando se administran en una cantidad eficaz para la prevención o terapia de enfermedades o afecciones promovidas por hormona gastrina en pacientes que tengan un pronóstico de alta probabilidad de tales enfermedades o afecciones, tratamiento de pacientes que ya padezcan tales enfermedades o afecciones. Las composiciones farmacéuticas de la invención también son útiles para el alivio de síntomas y la detención del progreso de enfermedades y afecciones promovidas por progastina.

25 Una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que incluye un fragmento intacto o funcional de un mAb antigastrina, particularmente un mAb antigastrina humanizado de la invención para el tratamiento de una enfermedad o afección promovida por gastrina se define como una cantidad que previene la aparición de o reduce la velocidad de progresión de la enfermedad o afección; más preferentemente una cantidad eficaz es una cantidad que estabiliza la enfermedad o afección; más preferentemente aún una cantidad eficaz es una cantidad que provoca regresión de la enfermedad o afección. Más preferentemente, una cantidad eficaz es una cantidad que cura completamente la enfermedad o afección.

35 Además, los mAb de la presente invención pueden aplicarse en inmunoensayos para supervisar la progresión de enfermedades y afecciones promovidas por hormona gastrina, en las que el nivel o cantidad de progastina proporciona un indicio del éxito del tratamiento o terapia, o de progresión de la enfermedad o afección.

40 Además, los mAb de la presente invención son útiles en métodos para evaluar un tratamiento de bloqueo de hormona progastina de un paciente que padece una enfermedad o afección promovida por hormona gastrina. El método incluye las etapas de:

- a) obtener una primera muestra de fluido biológico del paciente antes de o en los estadios tempranos de un tratamiento;
- b) determinar el nivel de progastina en la primera muestra por un método de inmunoensayo;
- 45 c) obtener una segunda muestra de fluido biológico del paciente después de un tiempo adecuado dentro del que tendría efecto el tratamiento;
- d) determinar el nivel de progastina en la segunda muestra por el método de inmunoensayo,
- e) comparar las cantidades determinadas de progastina en la primera muestra con la cantidad de progastina en la segunda muestra para determinar de este modo la eficacia del tratamiento de unión o bloqueo de  
 50 progastina.

El método anteriormente descrito aplicado a la evaluación de un tratamiento de unión a progastina o tratamiento de bloqueo en un paciente es particularmente valioso en la práctica clínica, en la que el momento de las decisiones para seguir adelante con un régimen terapéutico u otro puede ser crítico para el resultado para el paciente. El  
 55 método de la presente invención proporciona información en la que basar estas decisiones críticas. El método proporciona una medición de la cantidad de progastina antes de o en los estadios tempranos del tratamiento y proporciona una o más mediciones de progastina en uno o más periodos después del inicio del tratamiento, particularmente cuando se espera que el tratamiento haya comenzado a ser eficaz.

60 El tratamiento de bloqueo de progastina puede ser administración pasiva de anticuerpo antiprogastrina a un paciente. La sustancia de bloqueo de progastina puede ser cualquier sustancia de bloqueo de progastina, incluyendo pero sin limitación un anticuerpo antiprogastrina, particularmente un anticuerpo quimérico humano/no humano, un anticuerpo antiprogastrina monoclonal humanizado o uno completamente humano, o cualquier otra molécula que sea funcional en la unión de progastina.

65

La presente descripción también proporciona composiciones, métodos y kits para explorar muestras sospechosas de contener progastrina. Dicha exploración puede realizarse en muestras de pacientes, o muestras de laboratorio sospechosas de contener o producir dicho péptido. Un kit puede contener un anticuerpo de la presente invención. El kit puede contener un tampón adecuado y reactivos para detectar una interacción entre una muestra y anticuerpo de la presente invención. El reactivo proporcionado puede ser un agente radiomarcado, marcado con fluorescencia o marcado de forma enzimática capaz de unirse o interactuar con un anticuerpo de la presente invención.

El reactivo del kit puede proporcionarse como una solución líquida, unido a un soporte sólido o como un polvo seco. Cuando el reactivo se proporciona en una solución líquida, preferentemente, la solución líquida es una solución acuosa. Preferentemente, cuando el reactivo proporcionado está unido a un soporte sólido, el soporte sólido puede ser un medio cromatográfico, una placa de ensayo que tenga una pluralidad de pocillos, o un portaobjetos de microscopio. Cuando el reactivo proporcionado es un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado, que puede proporcionarse.

El kit se proporciona en un recipiente que generalmente incluye un frasco en el que el anticuerpo, antígeno o reactivo de detección puede situarse, y preferentemente aplicarse de forma adecuada en alícuotas. Los kits también incluirán típicamente un medio para contener el anticuerpo, antígeno y recipientes de reactivo para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico en los que se conservan los frascos deseados y uno o más compuestos químicos necesarios, tales como material de cromatografía, disolventes y eluyentes, tubos de ensayos, detergentes, anticuerpos y compuestos químicos para la reacción de detección.

En más realizaciones adicionales, la presente descripción se refiere a métodos de inmunodetección y kits asociados. Se propone que pueden emplearse progastrina o fragmentos peptídicos de la misma para detectar anticuerpos que tengan reactividad con la misma o, como alternativa, pueden emplearse anticuerpos preparados de acuerdo con la presente invención para detectar progastrina, moléculas miméticas de progastrina o péptidos que contienen epítomos de progastrina. En general, estos métodos incluirán obtener en primer lugar una muestra sospechosa de contener dicho precursor, péptido o anticuerpo, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o péptido de acuerdo con la presente invención, en condiciones eficaces para permitir la formación de un inmunocomplejo y después detectar la presencia del inmunocomplejo.

Se conoce bien en la técnica una amplia diversidad de métodos de detección de formación de inmunocomplejos, por ejemplo, ELISA, RIA, inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia puntual, transferencia por ranuras, transferencia de western, etc.), técnicas de inmunofluorescencia indirecta y métodos que se basan en la detección de cambios en parámetros físicos, tales como por ejemplo, resonancia de plasmón superficial y similares. En un método ampliamente usado se detecta la formación de inmunocomplejo a través del uso de un marcador, tal como un radiomarcador o un marcador enzimático (tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano rústico). Pueden acumularse ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo o una molécula acoplada a avidina para unión con un ligando biotinilado, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1. Producción de mAb para el extremo N terminal de progastrina humana

El péptido, SWKPRSQQPPC ("hProGastrina (1-9)-PC", SEC ID N°: 16) que contiene la secuencia de aminoácidos 1-9: SWKPRSQQP (SEC ID N°: 17) de progastrina humana, que forma el extremo N terminal y epítomo de progastrina humana, seguido de la secuencia enlazadora -Pro-Cys-, se sintetizó comercialmente por metodología de síntesis peptídica de fase sólida convencional.

El péptido se incorporó en un inmunógeno para inducir anticuerpos para el extremo N terminal de progastrina humana como sigue: el péptido se ligó en primer lugar de forma covalente con toxoide diftérico ("DT") para producir un conjugado de vehículo-péptido. Se determinó el número de unidades peptídicas sustituidas en cada vehículo de DT y, finalmente, el conjugado se formuló como un inmunógeno. Las técnicas usadas fueron como se describen en la Patente de Estados Unidos 5.622.702 de Gevas *et al.*

Brevemente, el péptido se conjugó de forma química con el vehículo con el reticulador heterobifuncional, ácido épsilon-maleimidocaproico N-hidroxisuccinimida ( $\epsilon$ -MCS). El conjugado se purificó por diálisis contra solución salina tamponada con fosfato sódico 0,1 M, pH 7,3 (PBS) y la concentración proteica se determinó por el ensayo de Lowry. El nivel de sustitución de péptido en DT (14,7 péptidos por 100.000 Da de peso molecular de DT) se determinó de forma molar por análisis de aminoácidos del conjugado. El conjugado disuelto se formuló después como un inmunógeno con Montanide ISA 703 (SEPPIC, Francia) como adyuvante mezclando la solución conjugada con el aceite Montanide ISA 703 a una relación 30/70 (p/p de solución conjugada/adyuvante). La mezcla se consiguió extrayendo los volúmenes apropiados de cada líquido en una jeringa y pasando después rápidamente las soluciones adelante y atrás entre esta y una segunda jeringa a través de un eje de enganche.

Los ratones se inmunizaron inicialmente por inyección i.p. con 0,1 mg del inmunógeno de conjugado de péptido DT/Montanide ISA 703 en un volumen de 0,1 ml. Se proporcionó una segunda inyección de una dosis idéntica tres semanas después de la primera inyección.

- 5 Para crear hibridomas que produjeran un mAb selectivo para el extremo N terminal de progastrina humana, se fusionaron células del bazo de los ratones inmunizados con una línea celular compañera de fusión de mieloma de ratón convencional por técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 4.196.265 *Método para producir anticuerpos de Kaprowski et al.*; "Selected Methods in Cellular Immunology" (Capítulo 17: Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, B. Mishell y S. Shiigi, W. H. Freeman y cía., San Francisco, 1980); Harlowe y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1987. Los ratones inmunizados se estimularon con una inyección i.p. de 0,1 mg del conjugado de péptido-DT anteriormente descrito en PBS 4 días antes de la recogida de sus células de bazo para la fusión celular. Se realizó selección inicial de células híbridas usando medio complementado con hipoxantina-aminopterina-timidina, como se describe en Mishell y Shiigi. Esta fusión se designó F490.

La primera etapa de selección para aislar hibridomas que producían mAb para el extremo N terminal de progastrina humana fue la selección de células para producción de anticuerpo para el péptido diana y para estabilidad de las líneas celulares híbridas. La selección de células que producían anticuerpo se consiguió explorando el medio de cultivo celular obtenido de los pocillos de cultivo tisular que contenían clones únicos para anticuerpo para el extremo N terminal de progastrina humana. La exploración fue por medio de un ELISA usando como antígeno diana un conjugado de péptido sintético hProGastrina(1-9)-PC unido a través de la cisteína 11 terminal con albúmina de suero bovino (BSA) como un vehículo inmunológico. Se conocen por los expertos en la materia técnicas de ELISA adecuadas, varios ejemplos de las cuales se enumeran posteriormente. Se obtuvieron líneas celulares estables clonando dos veces cada híbrido que produjo anticuerpos que se unían al conjugado de hProGastrina(1-9)-PC-BSA en el ensayo de ELISA. Por estos métodos, se obtuvieron ocho líneas celulares híbridas que produjeron mAb para el extremo N terminal de la progastrina humana. Estas líneas híbridas se designaron: 490-1; 490-2, 490-3; 490-4, 490-5; 490-6, 490-7 y 490-8.

### 30 EJEMPLO 2. Producción de mAb para la región N terminal de progastrina humana

El péptido, SQQPDAPLGPPC ("hProGastrina(6-14)-PPC". SEC ID N°: 18) que contenía la secuencia de aminoácidos 6-14 SQQPDAPLG (SEC ID N°: 19) de progastrina humana, que formaba un epítipo de región N terminal de progastrina humana, seguido de la secuencia enlazadora PPC, se sintetizó comercialmente por metodología de síntesis peptídica de fase sólida convencional.

El péptido SQQPDAPLGPPC (SEC ID N°: 18) se incorporó en un inmunógeno para inducir anticuerpos para la región N terminal de progastrina humana como se ha descrito en el Ejemplo I anterior. También se realizó inmunización y aislamiento de una fusión designada F491 como se ha descrito anteriormente.

La selección de hibridomas que producían mAb para la región N terminal de progastrina humana se consiguió explorando medio de cultivo celular obtenido de pocillos de cultivo tisular que contenían clones únicos para anticuerpo para la región N terminal de progastrina humana. La exploración fue por un ELISA usando como antígeno diana un conjugado que comprendía el péptido sintético hProGastrina(6-14)-PPC, unido a través de cisteína 12 con albúmina de suero bovino (BSA) como un vehículo inmunológico. Se obtuvieron líneas celulares estables clonando dos veces cada híbrido que produjo anticuerpos que se unían al conjugado de hProGastrina (6-14)-PPC-BSA en el ELISA. Se obtuvieron tres líneas celulares híbridas que produjeron mAb para la región N terminal de progastrina humana. Estas líneas celulares híbridas se designaron: 491-1, 491-2 y 491-3.

### 50 EJEMPLO 3. Producción de mAb para el extremo C terminal de progastrina humana

El péptido, CPPGRRSAEDEN ("hProGastrina(72-80)-PPC". SEC ID N°: 20) que tenía la secuencia de aminoácidos 72-80 GRRSAEDEN (SEC ID N°: 21) de progastrina humana en el extremo C terminal precedida por la secuencia de enlazador CPP-, se sintetizó comercialmente por metodología de síntesis peptídica de fase sólida convencional. El péptido se incorporó en un inmunógeno para inducir anticuerpos para el extremo C terminal de progastrina humana como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2 anteriores.

Los ratones se inmunizaron inicialmente por inyección i.p. con 0,1 mg del inmunógeno de conjugado de péptido DT /Montanide ISA 703 en un volumen de 0,1 ml. Se proporcionó una segunda inyección de una dosis idéntica tres semanas después de la primera inyección.

Para crear hibridomas que producían un mAb selectivo para el extremo C terminal de progastrina humana, se fusionaron células del bazo de los ratones inmunizados con una línea celular compañera de fusión de mieloma de ratón convencional por técnicas convencionales como se ha descrito anteriormente para producir la fusión designada F495.

La primera etapa de selección para aislar hibridomas que producían mAb para el extremo C terminal de progastrina humana fue la selección de células para producción de anticuerpo para el péptido diana y para estabilidad de las líneas celulares híbridas. La selección de células que producían anticuerpo se consiguió explorando el medio de cultivo celular obtenido de pocillos de cultivo tisular que contenían clones únicos para anticuerpo para el extremo C terminal de progastrina humana. La exploración se consiguió por medio de un ELISA usando como antígeno diana un conjugado que comprendía el péptido sintético hProGastrina(72-80)-PPC, unido a través de cisteína 1 con albúmina de suero bovino (BSA) como un vehículo inmunológico. Se obtuvieron líneas celulares estables clonando dos veces cada híbrido que producía anticuerpos que se unían al conjugado de hProGastrina(72-80)-PPC-BSA en el ELISA. Se obtuvieron cuatro líneas celulares híbridas que producían mAb para el extremo C terminal de progastrina humana. Estas líneas híbridas se designaron: 495-1; 495-2, 495-3 y 495-4.

#### Ejemplo 4. Títulos de ELISA de anticuerpos para regiones específicas de progastrina

El fin de este método analítico es detectar y determinar el título de anticuerpos antiprogastrina en muestras de ensayo por ELISA. El ELISA de anticuerpo antiprogastrina de la invención se basa en la unión específica de anticuerpos (que pueden ser anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales) con un conjugado de BSA-péptido de progastrina. La unión del péptido en ELISA confirma que el anticuerpo se une específicamente a un epítipo de progastrina dentro de la secuencia de péptido de progastrina del conjugado.

Los conjugados de progastrina-BSA ensayados incluyeron los tres conjugados enumerados en los Ejemplos 1, 2 y 3: hProGastrina (1-9)-PC-BSA; hProGastrina (6-14)-PPC-BSA; y hProGastrina (72-80)-PPC-BSA (respectivamente). Los conjugados se prepararon usando los mismos péptidos de progastrina usados para realizar los inmunógenos ligados a DT, usando el reactivo de reticulación  $\epsilon$ -MCS, como se ha descrito anteriormente.

En la primera etapa del ELISA, el conjugado se unió a los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos. El conjugado libre se retiró por una etapa de lavado usando un lavador de placas de 96 pocillos. Después se añadió el antisuero de ensayo (o control). El Ab antiprogastrina presente en el suero de ensayo se unió al conjugado debido a los epítipos peptídicos de progastrina presentes en el antígeno. Después se detectaron los anticuerpos unidos mediante la adición de un reactivo de Fosfatasa Alcalina anti-IgG, que es específico de especie para los anticuerpos antiprogastrina que se detectan. Por ejemplo, se detectaron anticuerpos antiprogastrina de ratón usando conjugado de Fosfatasa Alcalina-IgG de Conejo anti Ratón ("RAM-AP"), que se une al Ab antiprogastrina de ratón, como el reactivo de detección de Ab. El resto de AP de conjugado anti Ig-AP cataliza posteriormente la conversión del sustrato a un producto coloreado (p-nitrofenol). El desarrollo de color se midió como absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

Se usó suero antiprogastrina de ratón agrupado (recogido de los ratones inmunizados para la producción de hibridomas antiprogastrina) o líquido ascítico que contenía mAb de ratón antiprogastrina como un control positivo para ELISA que se dirigían al epítipo de progastrina que se usó para inducir los anticuerpos. Se usó el suero de la misma especie animal que la muestra de ensayo como control negativo (por ejemplo, suero normal o suero preinmune, etc.).

La magnitud del desarrollo del color en el intervalo lineal fue directamente proporcional a la cantidad de Ab antiprogastrina unido al antígeno diana. Se usó una representación de la serie de diluciones del suero convencional positivo (antiprogastrina) frente a los valores de absorbancia para generar curvas de unión. Los títulos de Ab antiprogastrina de las muestras de ensayo se determinaron después a partir de la mayor dilución que produce una absorbancia que puede distinguirse de la absorbancia obtenida con la misma dilución de control negativo (análisis de dilución limitante).

SOLUCIONES DE REACTIVO: Se seleccionaron las cantidades de reactivos y soluciones específicas para preparación en este método analítico solamente por conveniencia y se proporcionan como ejemplos, y no deben tomarse como limitaciones. Las cantidades reales pueden cambiarse de escala de acuerdo con los requisitos.

1. Se preparó tampón de carbonato con  $\text{NaN}_3$  0,02% ("tampón de carbonato") disolviendo 1,59 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 2,93 g de  $\text{NaHCO}_3$  en aproximadamente 750 ml de agua destilada y agitando con un agitador magnético. Se añadieron 4 ml de solución de  $\text{NaN}_3$  5% y se agitó. La solución se ajustó a 1,0 litros con agua. Se midió el pH (este debería ser de  $9,6 \pm 0,2$ ) y se ajustó con  $\text{NaOH}$  1,0 M o  $\text{HCl}$  1,0 M si es necesario). El tampón se almacenó en una nevera hasta que se necesitó.

2. Se preparó FTA (PBS) con Tween-20 0,05% y  $\text{NaN}_3$  0,02% ("FTA/Tween") disolviendo 9,23 g de FTA en aproximadamente 750 ml de agua purificada. Se añadieron 0,5 ml de Tween-20 y 4 ml de  $\text{NaN}_3$  5% y se ajustó a 1,000 litros con agua.

3. Se preparó BSA 1% en FTA/Tween ("BSA/FTA/Tween") disolviendo 10 g de BSA en 1000 ml de FTA/Tween.

4. Tampón de sustrato: se disolvieron 50 mg de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 448 ml de agua purificada. Se añadieron 50 ml de DEA y 2 ml de  $\text{NaN}_3$  5% y el pH se ajustó a 9,8 con  $\text{HCl}$  concentrado. El tampón se almacenó protegido

de la luz a temperatura ambiente.

5. PBS, pH 7,2: Se preparó a partir de FTA sólido (Tampón de Hemaglutinación de FTA (“FTA”) (Becton Dickenson Microbiology Systems, Cockeysville, MD)).

5 PROCEDIMIENTO DE ELISA: Recubrimiento con Antígeno: Se preparó una solución de antígeno diana conjugado con BSA-progastrina 1 µg/ml (descrito anteriormente) en tampón de Carbonato. Se necesitaba un mínimo de 5,2 ml de solución de antígeno para cada placa para recubrir. Se prepara solución de antígeno realizando una dilución 1:1000 de la solución madre de conjugado 1 mg/ml con tampón de Carbonato. Las placas pueden ser cualquier placa adecuada para ensayos de ELISA, tales como por ejemplo, Placas de Inmunoensayo Microliter<sup>®</sup>, estireno rígido (por ejemplo, placas de 96 pocillos de fondo en “U” Immulon<sup>®</sup> 2, Dynatech Laboratories, Inc., VA; o placas de 10 96 pocillos de fondo plano, poliestireno: por ejemplo, Placas Microwell, NUNC, distribuidor VWR). Las placas de fondo en “U” Immulon<sup>®</sup> 2 se recubren con antígeno añadiendo 50 µl/pocillo de la solución de antígeno. Las placas se 15 almacenaron en una cámara húmeda (por ejemplo, un recipiente cerrado con una toalla de papel húmeda) para evitar la pérdida de humedad y se incubaron durante una noche en el frigorífico (a 2 °C-8 °C).

PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE SUERO: Es aceptable cualquier serie de diluciones conveniente. Por ejemplo, se usaron series de diluciones en serie 1/10<sup>0,5</sup> del control convencional positivo y negativo y sueros de ensayo como se muestra en la Tabla 1. Las muestras se diluyeron en solución de BSA/FTA/Tween en placas de 96 pocillos de 20 fondo plano (los multipipeteadores de 12 canales permiten la dilución simultánea de hasta 12 sueros).

**TABLA 1** Se prepararon diluciones en serie comenzando a 1:1000 como se muestra

Placa de 96 pocillos	Suero	Título <sup>1</sup>
Nº de fila	Dilución	(= 1/Dilución)
A	1: 1.000 = 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>3</sup>
B	1: 3.162 = 3,16 x 10 <sup>-4</sup> = 10 <sup>-3,5</sup>	3,16 x 10 <sup>3</sup>
C	1: 10.000 = 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>4</sup>
D	1: 31.623 = 3,16 x 10 <sup>-5</sup> = 10 <sup>-4,5</sup>	3,16 x 10 <sup>4</sup>
E	1: 100.000 = 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>5</sup>
F	1: 316.230 = 3,16 x 10 <sup>-6</sup> = 10 <sup>-5,5</sup>	3,16 x 10 <sup>5</sup>
G	1: 1.000.000 = 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>6</sup>
H	1: 3.163.300 = 3,16 x 10 <sup>-7</sup> = 10 <sup>-6,5</sup>	3,16 x 10 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>. El título de cada dilución se calcula como el recíproco de la dilución.

25 Se preparó un volumen suficiente de una dilución de cada muestra para proporcionar un volumen de trabajo mínimo de 200 µl. Dependiendo del título de la muestra, se realizaron diluciones que comenzaban con una dilución de 1/100 (para muestra de título bajo) o 1/1000 (para muestra de título alto) de cada muestra en la fila A, continuando después con diluciones en serie bajando en cada columna hasta la fila H (véase Tabla 1), produciendo un total de 30 ocho diluciones de cada muestra. La serie de diluciones del control negativo se preparó comenzando a 1/100. Las muestras de la serie de diluciones del anticuerpo convencional positivo y el anticuerpo de control negativo/presangrado se procesaron por duplicado en cada placa.

LAVADO DE PLACAS: Usando el lavador de placas (por ejemplo, Ultrawash Plus; o, DynaWasher II (Dynatech Laboratories, Inc., VA) o equivalente) las placas recubiertas se lavaron cuatro veces cada una con FTA/Tween y después se “golpearon” las placas sobre toallas de papel para retirar la solución residual. UNIÓN DE 35 ANTICUERPO: Siguiendo la serie de diluciones en placa de muestras como se muestra en la Tabla 2 posterior, se transfirieron 50 µl/pocillo de la muestra diluida a los pocillos correspondientes de las placas en “U” recubiertas con antígeno. Las placas se incubaron en una cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente.

**TABLA 2: EJEMPLO DE UNA PREPARACIÓN DE ELISA DE PLACAS DE 96 POCILLOS**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución de Muestra
A	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-3</sup>
B	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-3,5</sup>
C	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-4</sup>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Dilución de Muestra
D	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-4,5</sup>
E	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-5</sup>
F	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-5,5</sup>
G	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-6</sup>
H	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	TS1	TS2	TS3	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	10 <sup>-6,5</sup>
Abreviaturas: Pos. = Muestra convencional positiva; Neg. = Muestra de control negativa/presangrado; TS 1-TS 8 = Muestras de ensayo													

5 REACTIVO DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS: Se preparó una dilución apropiada de Conjugado de Fosfatasa Alcalina Anti Ig en FTA/Tween. Se requería un mínimo de 5,2 ml por placa en el ensayo. Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente. Se añadieron 50 µl/pocillo de la solución de RAM-AP (Conjugado de Fosfatasa Alcalina-Anti Ig por ejemplo para ensayar anticuerpos de ratón antiprogastrina, Fosfatasa Alcalina de Conejo anti IgG de Ratón (H+L), (Zymed)) a cada pocillo en la placa en "U" y se incubaron a temperatura ambiente en la cámara húmeda durante 1 hora.

10 Para detectar anticuerpos antiprogastrina en suero obtenido de especies distintas de ratón, debe usarse un conjugado anti Ig-AP que es específico para la especie que produjo el suero de ensayo (por ejemplo, se detectan anticuerpos humanos antiprogastrina con un reactivo de AP-IgG antihumano, usado a la dilución establecida para cada lote de reactivo). El suero de control negativo y convencional positivo debería obtenerse de la misma especie que el suero de ensayo.

15 SOLUCIÓN DE SUSTRATO: se retiraron comprimidos de p-NPP (p-nitrofenilfosfato, proporcionado como Comprimidos de Sustrato de Fosfatasa, Sigma 104 ("p-NPP") (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)) del congelador y se permitió que se calentaran a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de su uso, se preparó una solución de 1 mg/ml de p-NPP añadiendo un comprimido de p-NPP a 5 ml de tampón de sustrato de DEA a temperatura ambiente. Cada alícuota de 5 ml de solución de sustrato fue suficiente para una placa de ensayo. La solución de sustrato se almacenó en oscuridad hasta que se usó.

25 ADICIÓN DE SUSTRATO: Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente. A todos los pocillos, comenzando con la columna 1, se añadieron simultáneamente 50 µl/pocillo de solución de p-NPP con un multipipeteador de 8 (o 12) canales comenzando con la fila A.

SUPERVISIÓN DE LA REACCIÓN: El desarrollo de la solución de sustrato se detuvo después de 10-15 minutos.

30 DETENCIÓN DE LA REACCIÓN: La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de NaOH 1,0 M a cada pocillo con el pipeteador de 8 (o 12) canales. La solución de NaOH se añadió a los pocillos en el mismo orden, y en el mismo momento, que se añadió la solución de sustrato. Los reactivos se mezclaron suavemente por agitación cuidadosa de la placa sobre la mesa.

35 MEDICIÓN DE LA ABSORBANCIA: La placa completa se leyó con un lector de ELISA. El lector de ELISA se ajustó para medir a A<sub>405 nm</sub> para p-nitrofenol.

40 ANÁLISIS DE DATOS: El título de anticuerpos de cada suero se determinó como sigue: la absorbancia obtenida para cada muestra se representó en las ordenadas (escala lineal) frente a (1/dilución) en las abscisas (escala logarítmica) para cada suero, incluyendo el patrón positivo, en una escala gráfica semilogarítmica. Representando la inversa de la dilución, el título podía leerse directamente en el eje X. Ocasionalmente, un valor de absorbancia estaba claramente fuera de la curva de unión para un suero particular (puntos atípicos); tales valores se excluyeron de la curva. El título de cada suero se determinó como la dilución final de anticuerpo de ensayo que puede distinguirse de la misma dilución de la muestra de control negativa, basándose en los valores de absorbancia. En general, el límite de la diferenciación entre los dos resultados es una absorbancia de 0,25 unidades de absorbancia o más (dependiendo de la variabilidad entre muestras en el ensayo).

45 **EJEMPLO 5. Determinación de especificidad de anticuerpos por ELISA de inhibición**

Se sigue el mismo método que en el Ejemplo anterior para el ELISA de inhibición de péptidos con las excepciones descritas posteriormente.

PREPARACIÓN DE INHIBIDOR: El péptido de hormona diana apropiado, en este caso péptido o péptidos que expresan epítipo o epítipos de progastrina, se prepararon como reservas de trabajo de 1  $\mu\text{mol/ml}$  (1000  $\mu\text{M}$ ). La serie de diluciones de inhibición se preparó a partir de la solución madre de trabajo, a relaciones de dilución de 1:2 a 1:10, produciendo un total de 8 a 12 diluciones dependiendo de la distribución en la placa.

5 Preparación de Dilución de Muestra: Se realizó una serie de valoraciones de la muestra antes del ensayo de inhibición para establecer la dilución de la muestra de anticuerpo al 50% de unión máxima. La muestra se preparó después a 2X la concentración de unión al 50%, para mezclar con volúmenes iguales de inhibidor peptídico y con tampón como un control en el ensayo de inhibición. La mezcla de muestra se incubó en una cámara húmeda durante aproximadamente 30 minutos y después se añadió a la placa de ELISA recubierta lavada y se incubó durante aproximadamente 1 hora en una cámara de humedad. El porcentaje de unión se determinó a partir de las lecturas de absorbancia (restadas del fondo) dividiendo la absorbancia obtenida de la muestra con inhibidor por la absorbancia obtenida del control de muestra sin inhibidor, y multiplicando este valor por 100. Finalmente, el porcentaje de inhibición se determinó restando el porcentaje de unión de 100%.

15 Las muestras de ensayo para su uso en este ensayo pueden ser suero, mAb en sobrenadante de cultivo celular, líquido ascítico o anticuerpo purificado por afinidad (Ab). Para Ab contra antígenos diana distintos del extremo amino terminal de progastrina, se usa el antígeno de hormona diana e inhibidor apropiados. Debería incluirse un inhibidor peptídico no relacionado como un control negativo.

#### 20 EJEMPLO 6. mAb antiprogastrina para isotipo y especificidad por ELISA

El mAb antiprogastrina descrito en el Ejemplo 1 (F490), Ejemplo 2 (F491) y Ejemplo 3 (F495) se caracterizaron con respecto a isotipo y especificidad por ELISA. El antígeno diana para cada mAb fue el mismo que el descrito en los Ejemplos 1 a 3. Por lo tanto, se ensayó mAb de fusión 490 frente a hProGastrina(1-9)-PC-BSA; se ensayó mAb de la fusión 491 frente a hProGastrina(6-14)-PPC-BSA; y se ensayó mAb de la fusión 495 frente a hProGastrina (72-80)-PPC-BSA. Los isotipos se determinaron por el método del Ejemplo 4, en el que los reactivos Ig anti ratón de conejo secundarios fueron específicos para isotipos de anticuerpo de ratón. La especificidad se determinó por el método del Ejemplo 5, usando los siguientes péptidos como inhibidores: hProGastrina(1-9)-PC, hProGastrina(6-14)-PPC, hProGastrina(72-80)-PPC, G17 humana, G34 humana, G17 humana extendida con Glicina y hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) como un control negativo.

Los resultados de estos ensayos se proporcionan en la Tabla 3. Como muestra la Tabla, todos los mAb eran de la subclase IgG1, con la excepción de los anticuerpos 491-2 y 495-2, ambos de los cuales eran de la subclase IgG2a. La Tabla también muestra que cada uno de los mAb individuales era específico para el epítipo usado para inmunización. Por lo tanto, todos los mAb de la serie 490 fueron específicos para la secuencia del epítipo de progastrina 1-9; todos los mAb de la serie 491 fueron específicos para la secuencia de epítipo de progastrina 6-14; y todos los mAb de la serie 495 fueron específicos para la secuencia de epítipo de progastrina 72-80. Estos mAb se consideran adecuados para ensayos diseñados para detectar y medir progastrina en muestras de ensayo biológicas consistentes en fluidos (por ejemplo, plasma, ninfa, líquido ascítico, saliva, etc.) y en muestras de ensayo tisulares (por ejemplo, muestras de ensayo de biopsia de origen tumoral o de tejido normal, o de células desprendidas de tales tejidos, etc.).

**TABLA 3: Caracterización de mAb de Fusiones 490, 491 y 495.**

Especificidad	mAb	Título de Punto Final	Subclase de Anticuerpo	Porcentaje de Inhibición con Péptido 25 micromolar						
				ProG 1-9	ProG 6-14	ProG 72-80	G17	G17-gly	G34	LHRH
Progastrina 1-9 (extremo N terminal)	490-1	30.000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-2	30.000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-3	30.000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-4	30.000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-5	10.000	Ig1	100	0	0	0	0	0	0
	490-6	10.000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-7	10.000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
	490-8	10.000	IgG1	100	0	0	0	0	0	0
Progastrina 6-14(región N terminal)	491-1	>30.000	IgG1	0	100	0	0	0	0	0
	491-2	10.000	IgG2a	0	100	0	0	0	0	0
	491-3	1.000	IgG1	0	100	0	0	0	0	0



Especificidad	mAb	Título de Punto Final	Subclase de Anticuerpo	Porcentaje de Inhibición con Péptido 25 micromolar						
				ProG 1-9	ProG 6-14	ProG 72-80	G17	G17-gly	G34	LHRH
Progastrina 72-80 (extremo C terminal)	495-1	30.000	IgG1	0	0	100	0	0	0	0
	495-2	30.000	IgG2a	0	0	100	0	0	0	0
	495-3	30.000	IgG1	0	0	100	0	0	0	0
	495-4	10.000	IgG1	0	0	100	0	0	0	0

#### EJEMPLO 7. Síntesis de patrones de referencia sustitutos (SRS) de progastrina para medición de progastrina por inmunoensayo

5 Para demostrar la utilidad de los SRS, se sintetizaron dos péptidos de SIRS de progastrina por síntesis peptídica de fase sólida. Los métodos de síntesis empleados fueron los de uso comercial habitual y que se conocen bien por los expertos en la materia.

10 Se sintetizó SRS 1 de progastrina para su uso en un ensayo para detectar y cuantificar la progastrina 1-80 humana. El péptido de SRS 1 de progastrina tuvo la siguiente estructura: [progastrina 1-9 - (PGGPP) - progastrina 72-80]. La secuencia de aminoácidos del péptido fue: SWKPRSQQPPGGPPGRRSAEDEN (SEC ID N°: 14). La masa de este péptido fue 2535,1, y la pureza de este péptido fue mayor del 90% cuando se ensayó por HPLC.

15 El SRS 2 de progastrina se sintetizó para su uso en un ensayo para detectar y cuantificar la progastrina 6-80 humana. El péptido de SRS 2 de progastrina tenía la siguiente estructura: [progastrina 6-14 - (PPGPP) - progastrina 72-80]. La secuencia de aminoácidos del péptido fue: SQQPDAPLGGPPGRRSAEDEN (SEC ID N°: 15). La masa de este péptido fue de 2432,4 y la pureza de este péptido fue mayor del 90% cuando se ensayó por HPLC.

#### 20 EJEMPLO 8. Ensayo inmunoenzimométrico utilizando mAb antiprogastrina y péptidos de SRS de progastrina para medir la progastrina

25 Se usaron los siguientes métodos analíticos (ensayo inmunoenzimométrico) para determinar la progastrina 1-80 humana libre (no en complejo) o progastrina 6-80 humana presente en fluidos biológicos tales como plasma humano, usando anticuerpos monoclonales y/o policlonales dirigidos al extremo N terminal o al C terminal de la forma molecular particular de progastrina que se ensaya. Como alternativa, puede usarse una combinación de un anticuerpo policlonal dirigido al extremo N terminal o al C terminal de la molécula en combinación con un anticuerpo monoclonal dirigido al extremo C terminal o al N terminal de la molécula respectivamente.

30 **1. Recubrimiento de Placa:** Se recubrió con un anticuerpo selectivo para el extremo N terminal de la forma molecular de progastrina humana particular para ensayar a una concentración óptima la superficie de los micropocillos de una placa de ensayo. Se usaron placas de ensayo de placas de ELISA F 96 NUNC Maxisorp, (cat. N° 439454) y la solución de recubrimiento de anticuerpos se preparó en tampón de borato sódico (20 mM, pH 8,0, que contenía azida sódica 0,1%). La concentración de mAb purificado por afinidad en la solución de recubrimiento fue preferentemente de aproximadamente 5 µg/ml. Se añadieron 100 µl de solución de mAb por pocillo y se permitió que el recubrimiento continuara durante una noche a 4 °C en una caja sellada humidificada. Las placas se recubrieron con mAb 490-1 purificado por afinidad para la detección de progastrina 1-80, usando SRS 1 para establecer una curva patrón en el ensayo. Las placas se recubrieron con mAb 491-1 purificado por afinidad para la detección de progastrina 6-80, usando SRS 2 para establecer una curva patrón en el ensayo.

40 **2. Lavado de placas:** La solución de recubrimiento se retiró y se añadió tampón de lavado (aproximadamente 400 µl por pocillo) y después se retiró. Este ciclo de lavado se repitió tantas veces como fue necesario; generalmente, tres o cuatro lavados en total. El tampón de lavado fue tampón fosfato 0,010 M; cloruro potásico 0,0027 M y cloruro sódico 0,137 M, pH 7,4, que contenía Tritón X-100 0,01% p/v. El lavado de las placas puede ser automático.

45 **3. Bloqueo de placas:** Se añadió tampón de bloqueo que contenía proteína y detergente (BSA 1%, Tritón X-100 0,1% en tampón de recubrimiento) a los micropocillos (200 µl/pocillo) y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una caja humidificada. Las placas se almacenaron refrigeradas a aproximadamente 4 °C en esta forma.

50 **4. Adición de muestra y patrón:** Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente. Se prepararon patrones de referencia (tales como, por ejemplo, SRS 1, SRS 2 o formas de progastrina auténtica; o péptido de control negativo tal como Gastrina 17) como una serie de diluciones para generar curvas patrón. En los ensayos

de este ejemplo, SRS 1 y 2 se prepararon a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y se diluyeron a 100 fM en una serie de diluciones 1:10. Los patrones y muestras de ensayo se prepararon en tampón de ensayo (BSA 1%,  $\gamma$  globulina bovina 0,1% preparada en tampón de lavado). Las soluciones se añadieron después a cada pocillo (100  $\mu\text{l}$ /pocillo). Se permitió que la reacción continuara durante 2 horas a temperatura ambiente en una caja humidificada.

La concentración de antígeno óptima se determinó generando una curva patrón usando concentraciones conocidas de SRS de progastrina de la forma para ensayar, teniendo la curva patrón la sensibilidad y precisión requeridas sobre el intervalo de concentraciones útiles requerido. Para progastrina (1-80 o 6-80), el intervalo de concentración de progastrina útil del ensayo fue generalmente del fondo (aproximadamente 1 pM o menos) a aproximadamente 100 nM. Puede conseguirse mayor precisión usando una serie de diluciones más estrecha del patrón de referencia, tal como una serie de diluciones 1:2.

Se reconocerá inmediatamente que la sensibilidad y precisión del ensayo pueden modificarse fácilmente o potenciarse mediante alteración de otros parámetros de ensayo, tales como la selección del mAb particular para recubrimiento de pocillos o para marcaje enzimático, las concentraciones de reactivos, la composición de los tampones, la selección de los sistemas de enzima-sustrato, los tiempos de incubación y otros parámetros que pueden modificarse para adecuarse a los requisitos del ensayo. Puede determinarse fácilmente la sensibilidad y precisión apropiadas sobre el intervalo requerido por los expertos habituales en la materia sin experimentación indebida.

**5. Adición de conjugado:** Después del lavado, se añadió tampón de ensayo que contenía anticuerpo monoclonal o policlonal específico para el extremo C terminal de la forma de progastrina para ensayar (conjugado con un marcador enzimático) a cada pocillo. En el caso de este ejemplo, los mAb contra el extremo C terminal de progastrina se purificaron por afinidad y después se acoplaron a peroxidasa de rábano rusticano). Se mostró que los mAb conservaban unión con el extremo C terminal de progastrina y tenían actividad de HRP. Se realizaron conjugados separados con cada uno de los cuatro mAb 458-1 a 458-4. Para los fines de este ensayo, los conjugados se usaron de forma separada y no mezclada. Los conjugados se usaron a dilución 1:2000 de la solución madre de 630  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  por pocillo. Se permitió que la reacción continuara a temperatura ambiente (concretamente +22  $^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos 1 hora.

**6. Adición de sustrato:** Los pocillos se lavaron como se ha descrito anteriormente y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato Solución TMB (Pierce) a cada pocillo. Se permitió que las reacciones continuaran durante 30 minutos, después se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de parada de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 M a cada pocillo. Los ejemplos de sustratos de enzima adecuados para su uso en el desarrollo del compuesto de detección incluyen nitrofenilfosfato para fosfatasa alcalina o tetrametilbencidin sulfonato (TMBS) para peroxidasa de rábano rusticano. El grado de desarrollo del color, leído como Unidades de Absorbancia (UA, leído a 450 nm en el caso de TNBS o a 405 nm en el caso de p-nitrofenol) es indicativo de la cantidad de progastrina presente en la muestra de ensayo, y la concentración real puede determinarse leyendo la absorbancia de la muestra de ensayo frente a una curva patrón generada con concentraciones conocidas de SRS o frente a una curva patrón generada con progastrina auténtica.

**7. Lectura:** Cuando se consiguió suficiente señal de ensayo la señal se midió usando un lector de microplacas/espectrofotómetro.

**8. Procesamiento de Datos:** Las señales de ensayo obtenidas con soluciones convencionales conocidas de la forma de SRS (o progastrina) se usaron para construir una curva de calibración (señal frente a concentración). La curva de calibración se usó para interpolar concentraciones de la forma de hormona gastrina en muestras de ensayo.

#### EJEMPLO 9. Ensayo inmunoenzimométrico diseñado para medir progastrina 1-80

Los resultados del ensayo para progastrina 1-80 se muestran en la Tabla 4. Los métodos generales para este ensayo se describen en el Ejemplo 8. En este ensayo, los pocillos se recubrieron con mAb 490-1 purificado por afinidad, específico para el extremo N terminal de progastrina. El conjugado de detección usado fue conjugado de mAb 495-1-HRP. Como muestran los datos, se detectó SRS 1 a concentraciones de hasta 100 pM; mientras que el SRS 2 cercanamente relacionado se detectó solamente a 100 nM. Por lo tanto, el intervalo de trabajo de este ensayo para progastrina 1-80 estaría por debajo de 100 nM y por encima de 10 pM. No se detectó el péptido de control negativo gastrina 17. Este ejemplo demuestra que el mAb de progastrina puede usarse para ensayar con respecto a progastrina 1-80. Este ejemplo también demuestra la utilidad de SRS 1 como una molécula convencional para medir progastrina 1-80 por ELISA.

**TABLA 4: Ensayo para progastrina 1-80.**

Concentración Peptídica	Valores de Absorbancia (fondo restado)		
	SRS1	SRS 2	Gastrina 17
10 $\mu$ M	NT	0,942	NT
1 $\mu$ M	NT	0,955	NT
100 nM	0,951	0,109	0,001
10 nM	1,079	0	0,001
1 nM	0,923	0	0,002
100 pM	0,094	0,002	0
10 pM	0,005	0,002	0
1 pM	0	NT	0,001
100 fM	0	NT	0,015

**EJEMPLO 10. Ensayo inmunoenzimométrico diseñado para medir progastrina 6-80**

5 Los resultados del ensayo para progastrina 6-80 se muestran en la Tabla 5. Los métodos generales para este ensayo se describen en el Ejemplo 8. En este ensayo, los pocillos se recubrieron con mAb 491-1 purificado por afinidad, específico para la región N terminal de progastrina (aminoácido 6-14). El conjugado de detección usado fue conjugado de mAb 495-1-HRP. Como muestran los datos, se detectó SRS 2 a concentraciones de hasta 100 pM (como la absorbancia a esta concentración está por encima de la línea basal, el ensayo pudo detectar menos de 100 pM); mientras que el SRS 1 cercanamente relacionado se detectó solamente hasta 100  $\mu$ M. Por lo tanto, el intervalo de trabajo de este ensayo para progastrina 6-80 estaría por debajo de 100  $\mu$ M y por encima de 10 pM. No se detectó el péptido de control negativo gastrina 17. Este ejemplo demuestra que el mAb de progastrina puede usarse para ensayar con respecto a progastrina 6-80. Este ejemplo también demuestra la utilidad de SRS 2 para medir progastrina 6-80.

15

**TABLA 5: Ensayo para progastrina 6-80.**

Concentración Peptídica	Valores de Absorbancia (fondo restado)		
	SRS1	SRS 2	Gastrina 17
100 $\mu$ M	0,191	3,407	0,002
10 $\mu$ M	0,015	2,324	0,002
1 $\mu$ M	0,010	2,721	0,002
100 nM	0,010	1,856	0,002
10 nM	0,008	1,431	0,001
1 nM	0,009	0,462	0,013
100 pM	0,004	0,053	0
10 pM	0	NT	0,001
1 pM	0	NT	0,015
NT: No ensayado.			

**EJEMPLO 11. Selección de mAb óptimo para aplicaciones específicas**

20 A pesar de compartir la especificidad por un epítipo dado, diferentes mAb contra un epítipo dado pueden diferir en su rendimiento en aplicaciones específicas. Por lo tanto, los mAb deben compararse con respecto a su actividad en cada circunstancia, para que se seleccione el mAb con rendimiento óptimo para su uso en una aplicación particular. Este ejemplo demuestra como los mAb específicos para el extremo C terminal de progastrina difieren en su capacidad para actuar como anticuerpos de detección de progastrina en el ensayo inmunoenzimométrico para progastrina y proporcionan una formulación óptima.

25

El reactivo de anticuerpo de detección en el ensayo cuantitativo para progastрина (descrito en el Ejemplo 8) es un mAb dirigido contra el epítipo del extremo C terminal de progastрина unido a HRP. Se aislaron cuatro mAb específicos para el epítipo del extremo C terminal de progastрина clonando a partir del número de fusión 495, descrito anteriormente. Estos fueron los mAb 495-1, 495-2, 495-3 y 495-4. Para preparar conjugados de HRP de estos mAb, los inventores siguieron metodologías familiares para los expertos en la materia, empleando los componentes únicos de los inventores junto con kits disponibles en el mercado en etapas clave. Por lo tanto, cada uno de los mAb 495-1 a -4 se produjeron por separado como mAb de líquido ascítico en ratones (como se describe en Mishell y Shiigi, capítulo 17). La presencia de un mAb en el líquido ascítico se confirmó por ELISA de unión directa contra el antígeno diana hProGastrina (72-80)-PPC-BSA, como se ha descrito anteriormente.

Los mAb se purificaron por afinidad del líquido ascítico por cromatografía en columna sobre hProGastrina(72-80)-PPC unido a gel sulfolink (Pierce) y se eluyeron con tampón de glicina, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el Kit de Sulfolink de Pierce. Los mAb se purificaron adicionalmente por diafiltración en una unidad de filtración Amicon, y la concentración proteica final se determinó por medición de A<sub>280</sub>. Cada una de las cuatro preparaciones de mAb purificado se conjugó con HRP usando el kit de Pierce EZ-Link™ Plus. Después de la purificación, se comprobó la actividad de unión de HRP y antígeno de cada conjugado de mAb-HRP por ELISA de unión directa frente al antígeno diana hProGastrina(72-80)-PPC-BSA, y se descubrió que todos estaban activos. Las concentraciones finales de los cuatro conjugados se establecieron de 0,63 a 0,68 mg/ml.

Para comparar el rendimiento de los cuatro conjugados de mAb-HRP en el ensayo inmunoenzimométrico para progastрина, el ensayo se ejecutó como se ha descrito en el Ejemplo 9 usando SRS 1 y en el Ejemplo 10 usando SRS 2. Cada uno de los conjugados de 495 mAb-HRP se ensayó por separado en cada uno de los ensayos individuales, como los reactivos de detección para SRS 1 y 2 capturados. Los conjugados de mAb-HRP se usaron a diluciones 1:2000 de las soluciones madre. En el ensayo para detectar SRS 2 (para progastрина 6-80), en el que la placa se recubrió con mAb 491-1 y se capturó de este modo SRS 2, el conjugado óptimo para detección del SRS 2 capturado fue 495-1-HRP. Esto puede verse en la Tabla 6 en la que 458-1-HRP detectó SRS 2 a una concentración de 100 pM. Los otros tres conjugados fueron menos eficaces, detectando SRS 2 a 1 nM. Por lo tanto, el conjugado de 495-1-HRP se usaría como el reactivo de detección en el ensayo inmunoenzimométrico para progastрина 6-80, usando SRS 2, como se procesa en las condiciones de este ejemplo.

TABLA 6: Comparación de Conjugados de mAb 495-HRP como Reactivos de Detección en el Ensayo Inmunoenzimométrico para Progastрина 6-80

Concentración de Péptido de SRS 2	Valores de Absorbancia (fondo restado)			
	495-1-HRP	495-2-HRP	495-3-HRP	495-4-HRP
100 μM	3,407	0,788	3,220	0,809
10 μM	2,324	0,855	1,437	0,671
1 μM	2,721	0,977	1,117	0,582
100 nM	1,856	0,814	0,857	0,571
10 nM	1,431	0,359	0,470	0,254
1 nM	0,462	0,012	0,096	0,029
100 pM	0,053	0	0,007	0,003

Se obtuvieron resultados similares cuando se ensayaron los cuatro conjugados de mAb 495-HRP en el ensayo de SRS 1 con respecto a progastрина 1-80, demostrando la superioridad del conjugado 495-1-HRP en estos ensayos.

**Depósito de líneas celulares de hibridoma**

Los siguientes hibridomas se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) el 1 de septiembre de 2004:

1. Al Hibridoma 490-1 que produce MAb 490-1 se le asignó el número de referencia PTA-6189.
2. Al Hibridoma 491-1 que produce MAb 491-1 se le asignó el número de referencia PTA-6190.
3. Al Hibridoma 495-1 que produce MAb 495-1 se le asignó el número de referencia PTA-6191.

Organización solicitante

Calle: 1628 JFK Boulevard  
 Ciudad: Filadelfia  
 Estado:  
 País: Filadelfia, Estados Unidos

Código postal: PA 19103  
 Número de teléfono:  
 Número de fax:  
 Dirección de correo electrónico:  
 5 <110> Nombre de la organización: Aphton Corporation

Proyecto de la solicitud

10 <120> Título: Anticuerpos monoclonales para progastrina  
 <130> Referencia del archivo de solicitud: Aphton 0083  
 <140> Número de solicitud actual:  
 <141> Fecha de presentación actual:

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 MQRLCVYVLI FALALAAFSE ASWKPRSQQP DAPLGTGANR DLELPWLEQQ GPASHHRRQL 60  
 20 GPQGPPHLVA DPSKKQGPWL EEEEEAYGWM DFGRRSAEDE N 101  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 101  
 Nombre de secuencia: preprogastrina humana (SEC ID N° 1)  
 Descripción de secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 30 EGPWLEEEEE AYGWMDF 17  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 17  
 Nombre de secuencia: gastrina madura humana G17 (SEC ID N° 2)  
 Descripción de secuencia:

35 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 40 EGPWLEEEEE AYGWMDFG 18  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 18  
 Nombre de secuencia: G17-gly humana (SEC ID N° 3)  
 Descripción de secuencia:

45 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 50 ELGPQGPPHL VADPSKKKGP WLEEEEEAYG WMDF 34  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 34  
 Nombre de secuencia: gastrina humana G-34 (SEC ID N° 4)  
 Descripción de secuencia:

55 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 60 ELGPQGPPHL VADPSKKQGP WLEEEEEAYG WMDF 35  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 35  
 Nombre de secuencia: gastrina humana G34-gly (SEC ID N° 5)  
 Descripción de secuencia:

65 Secuencia

5 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SWKPRSQQP 9  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 9  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 6)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SQQPDAPLG 9  
 15 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 9  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 7)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

20 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 GRRSAEDEN 9  
 25 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 9  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 8)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

30 <213> Nombre del organismo: Completamente artificial  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 PPGGPP 6  
 35 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 6  
 Nombre de secuencia: péptido enlazador (SEC ID N° 9)  
 Descripción de secuencia:

Elemento

40 Secuencia: péptido enlazador (SEC ID N° 9):  
 <221> Clave elemento: PÉPTIDO  
 <222> Localización desde: 1  
 <222> Localización hasta: 6  
 Otra información:  
 45 Unión CDS: No

Secuencia

50 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SWKPRSQQPG RRSAEDEN 18  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 18  
 55 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 10)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

60 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SQQPDAPLGG RRSAEDEN 18  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 18  
 65 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 11)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

5 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SWKPRSQQPG GGRRSAEDEN 20  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 20  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 12)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SWKPRSQQPP GRRSAEDEN 19  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 19  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 13)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

25 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SWKPRSQQPP GGPPGRRSAE DEN 23  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 23  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 14)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

35 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SQQPDAPLGP PGGPPGRRSA EDEN 24  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 24  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 15)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

45 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SWKPRSQQPPC 11  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 11  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 16)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

55 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SWKPRSQQP 9  
 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 9  
 Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 17)  
 Descripción de secuencia:

Secuencia

65 <213> Nombre del organismo: Ser humano  
 <400> Cadena de presecuencia:  
 SQQPDAPLGP PC 12  
 <212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 12  
Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 18)  
Descripción de secuencia:

5 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano  
<400> Cadena de presecuencia:  
SQQPDAPLG 9

10 <212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 19)  
Descripción de secuencia:

15 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano  
<400> Cadena de presecuencia:  
CPPGRRSAED EN 12

20 <212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 12  
Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 20)  
Descripción de secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del organismo: Ser humano  
<400> Cadena de presecuencia:  
GRRSAEDEN 9

30 <212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de secuencia: progastrina (SEC ID N° 21)  
Descripción de secuencia:



**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a progastrina, en el que:
- 5 el anticuerpo no se une a gastrina-17 (G17), gastrina-34 (G34), gastrina-17 extendida con glicina (G17-Gly) o gastrina-34 extendida con glicina (G34-Gly); y el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal que se une a un epítopo en el tramo N terminal de progastrina, en el que el epítopo aparece dentro de la secuencia de aminoácidos SWKPRSQQP (SEC ID N°: 6) o SQQPDAPLG (SEC ID N°: 7).
- 10 2. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que es el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 490-1 (ATCC N° de Referencia PTA-6189) o por el hibridoma 491-1 (ATCC N° de Referencia PTA-6190).
- 15 3. Una forma de cadena sencilla de un anticuerpo de la reivindicación 1 que se une al extremo N terminal de progastrina.
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 que es un anticuerpo de mamífero.
- 20 5. Un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que se une al epítopo unido con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 490-1 (ATCC N° de Referencia PTA-6189) o hibridoma 491-1 (ATCC N° de Referencia PTA-6190).
- 25 6. Un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5 que es un anticuerpo murino, quimérico humano/ratón, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
- 30 7. Una combinación, que comprende dos o más anticuerpos monoclonales seleccionados de entre los anticuerpos monoclonales de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un hibridoma seleccionado de entre el hibridoma 490-1 (ATCC N° de Referencia PTA-6189) e hibridoma 491-1 (ATCC N° de Referencia PTA-6190).
- 35 9. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
10. Uso de un anticuerpo monoclonal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección promovida por gastrina.
- 40 11. Un anticuerpo monoclonal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método para tratar una enfermedad o afección promovida por gastrina.
- 45 12. Un inmunoensayo de progastrina, que comprende:
- a) poner en contacto una muestra para ensayar con respecto a progastrina con un anticuerpo monoclonal en condiciones adecuadas para unión de anticuerpo y permitir que cualquier progastrina presente forme un complejo de monoclonal-progastrina, en el que el anticuerpo monoclonal se selecciona de entre un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; y
- b) detectar la presencia o ausencia del complejo de anticuerpo monoclonal-progastrina por un método de inmunodetección.
- 50 13. El inmunoensayo de progastrina de la reivindicación 12, en el que el método de inmunodetección es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de inmunohistoquímica (IHC), un ensayo de inmunofluorescencia (IF), un ensayo de aglutinación, un ensayo de transferencia de western, un ensayo de transferencia puntual, un ensayo de transferencia por ranuras, o un método de detección de resistencia de plasmón superficial.
- 55 14. Un método para diagnosticar una enfermedad o afección promovida por gastrina en un paciente, que comprende:
- (a) realizar un inmunoensayo de la reivindicación 12 o reivindicación 13 para determinar el nivel de progastrina en una muestra de fluido biológico del paciente; y
- 60 (b) comparar el nivel de progastrina en la muestra con el nivel de progastrina en una muestra de fluido biológico de uno o más individuos de control o con un patrón de referencia y, si son diferentes, diagnosticar la enfermedad o afección.