

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 245**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2011 PCT/EP2011/000048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11083090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2011 E 11700068 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2542583**

54 Título: **Procedimientos para tratar el cáncer de mama**

30 Prioridad:

08.01.2010 US 293612 P

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

02.03.2018

73 Titular/es:

PROGASTRINE ET CANCERS S.À R.L. (33.3%)
11, Côte d'Eich
1450 Luxembourg, LU;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)

72 Inventor/es:

FLOCH, JEAN-FRANÇOIS;
HOUHOU, LEÏLA;
CAILLER, FRANÇOISE;
JOUBERT, DOMINIQUE y
HOLLANDE, FRÉDÉRIC

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 657 245 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

Procedimientos para tratar el cáncer de mama.

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a procedimientos para tratar y prevenir el cáncer de mama y su recurrencia mediante la administración de una composición que comprende un anticuerpo específico para progastrina.

10

Antecedentes

A pesar de décadas de investigación básica y clínica, el cáncer de mama continúa siendo una de las enfermedades no contagiosas más mortales que afecta principalmente a mujeres, aunque también se han diagnosticado varones con esta enfermedad. Según el proyecto GLOBOCAN del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, se estimó que en 2008 la incidencia de cáncer de mama afectó a casi 1,4 millones y que en el mismo año más de 450 mil mujeres murieron por esta enfermedad. Aunque se ha aprendido mucho recientemente con respecto a cómo actúa el cáncer de mama a nivel molecular, los médicos aún confían en modalidades terapéuticas tales como la cirugía, la radiación, el tratamiento hormonal y la quimioterapia que serían familiares a oncólogos de hace una generación. El diagnóstico precoz, posibilitado por avances en la tecnología de formación de imágenes y en diagnósticos moleculares, es un factor de gran importancia en el éxito de cualquier tratamiento. Aunque la eficacia de todos estos tratamientos ha mejorado a lo largo de los años, la mejora en las tasas de curación y el aumento de la longevidad han sido graduales. Incluso los nuevos tratamientos dirigidos que son consecuencia de la revolución en la oncología molecular presentan, en su mayor parte, resultados solo modestamente mejorados. Por ejemplo, la Herceptina®, que se dirige al receptor HER2, es eficaz solo en el 20-25% de mujeres que padecen cáncer de mama cuyos tumores son positivos a HER2.

Dos de los aspectos más complicados en la gestión de pacientes con cáncer de mama son la metástasis y la recurrencia.

La metástasis tiene lugar cuando el cáncer de mama se extiende a órganos distantes desde el tumor primario. Aunque es a menudo posible extirpar el tumor primario, es la metástasis la que frecuentemente acaba causando la muerte del paciente, debido a que los tumores se vuelven demasiado numerosos o están demasiado entrelazados con tejido huésped sano como para tratarlos quirúrgicamente. Según la Sociedad Estadounidense contra el Cáncer (*American Cancer Society*), la tasa de supervivencia de cinco años en los Estados Unidos para pacientes a los que se diagnosticó por primera vez un cáncer de mama en el estadio IIIB en 2001 y 2002 fue del 41%, que se redujo a solo el 15% en el estadio IV (es decir, cáncer de mama metastásico).

La recurrencia es el fenómeno mediante el cual el cáncer de mama reaparece después de responder inicialmente al tratamiento y, aparentemente, desaparecer. Además de la carga emocional infligida a los pacientes y a sus familias, la recurrencia es problemática debido que el cáncer que ha reaparecido puede responder peor al tratamiento o a los tratamientos que fueron eficaces en la lucha contra el primer cáncer. En otros pacientes los tratamientos previos contra el primer cáncer pueden haber causado efectos secundarios irreversibles, tales como daños cardíacos o neurológicos. En dichos pacientes, los riesgos de utilizar el mismo tratamiento para luchar contra el cáncer recurrente pueden ser demasiado grandes. En estas circunstancias, un paciente puede tener menos opciones de tratamiento con un riesgo concomitantemente superior de mortalidad.

Aunque las mejoras en cirugía, radioterapia, tratamiento hormonal, quimioterapia y el advenimiento de tratamientos dirigidos han aumentado la longevidad de pacientes afectados por cáncer de mama, muchos de dichos pacientes continúan muriendo en un periodo de meses a unos pocos años después del diagnóstico. Por lo tanto, existe la necesidad urgente de nuevos tratamientos eficaces contra el cáncer de mama y su recurrencia.

55 **Sumario**

La presente invención proporciona un anticuerpo para su utilización en el tratamiento, la prevención o la prevención del cáncer de mama sensible a progastrina tal como se define en las reivindicaciones.

La progastrina está asociada con el cáncer (documento WO 2008/076454, Jiang *et al.*, World Chinese Journal Of Digestology 200704 CN, (200704), vol. 15, N° 9, ISSN 1009-3079, páginas 980 - 985; Reubi *et al.*, Cancer Res. 57(7): 1377-1386, 1997). El documento WO 2007/135542 divulga un procedimiento para tratar y/o prevenir el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis producida por células que segregan progastrina utilizando anticuerpos anti-progastrina policlonales. Se ha informado de anticuerpos monoclonales contra progastrina, aunque no está claro si estos anticuerpos se unen realmente a la progastrina (documento WO 2006/032980). Se conocen en la técnica tratamientos contra el cáncer con anticuerpos (Chapman *et al.*, Adv Drug Deliv Rev. 54(4): 531-545, 2002; Petkova *et al.*, Int Immunol, 18 (12): 1759-1769, 2006; Duffy, Clin

Biochem. 34(5): 347-352, 2001; Piyush *et al.*, Cell. 138(4): 645-659, 2009; documento WO 01/62288; documento WO 2009/042618; documento EP 2062597; documento US 2006/051818).

5 Se proporcionan procedimientos para tratar pacientes con necesidad de tratamiento contra el cáncer de mama sensible a progastrina mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende anticuerpos que se unen específicamente a progastrina. En algunas formas de realización, el cáncer de mama es metastásico y se ha extendido a los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro. En otras, el cáncer de mama es un cáncer de mama primario. En una serie de formas de realización, los anticuerpos de la composición son eficaces para reducir la proliferación, o aumentar la tasa de muerte celular, de células de cáncer de mama sensibles a progastrina, reducir el número o el tamaño promedio de las metástasis de cáncer de mama o reducir la concentración de progastrina en sangre en pacientes tratados.

15 En algunas formas de realización, la composición puede administrarse antes o después de cirugía o radioterapia o antes, concurrentemente o después de la administración de un agente quimioterápico o un agente de tratamiento hormonal eficaz para el tratamiento de cáncer de mama. La composición también puede administrarse antes, concurrentemente o después de un segundo anticuerpo terapéutico eficaz contra el cáncer de mama que tiene especificidad por sustancias diferentes a la progastrina. En algunas de estas formas de realización, el segundo anticuerpo tiene especificidad por VEGF o HER2 y puede ser bevacizumab, trastuzumab y pertuzumab.

20 También se proporcionan procedimientos para prevenir el cáncer de mama sensible a progastrina mediante la administración a un paciente con necesidad de prevención del cáncer de mama sensible a progastrina de una composición que comprende un anticuerpo que se une específicamente a progastrina en una cantidad eficaz para prevenir el cáncer de mama sensible a progastrina. El cáncer de mama puede ser primario o metastásico. En otras formas de realización, las células del cáncer de mama contienen una mutación en los genes BRCA1 o BRCA2.

30 En una serie de formas de realización, los anticuerpos de la composición son eficaces para reducir la proliferación, o aumentar la tasa de muerte celular, de células de cáncer de mama sensibles a progastrina, o reducir la concentración de progastrina en sangre en pacientes tratados.

35 En algunas formas de realización, la composición puede administrarse concurrentemente o después de la administración de un agente quimioterápico o un agente de tratamiento hormonal eficaz para prevenir el cáncer de mama sensible a progastrina. La composición también puede administrarse concurrentemente o después de un segundo anticuerpo terapéutico eficaz para prevenir el cáncer de mama que tiene especificidad por sustancias diferentes a la progastrina, tales como HER2.

40 También se proporcionan procedimientos para prevenir la recurrencia del cáncer de mama sensible a progastrina mediante la administración a un paciente con necesidad de prevención de recurrencia del cáncer de mama sensible a progastrina de una composición que comprende un anticuerpo que se une específicamente a progastrina en una cantidad eficaz para prevenir la recurrencia del cáncer de mama sensible a progastrina. En algunos de estos procedimientos el paciente se sometió previamente a un tratamiento contra el cáncer de mama, tal como cirugía, radioterapia, tratamiento biológico, inmunoterapia, tratamiento hormonal y quimioterapia, después del cual el cáncer de mama aparentemente desapareció.

45 En una serie de formas de realización, los anticuerpos de la composición son eficaces para reducir la proliferación o aumentar la tasa de muerte celular de células del cáncer de mama sensible a progastrina, o reducir la concentración de progastrina en sangre en pacientes tratados. En otras formas de realización, la composición puede administrarse concurrentemente o después de un segundo agente terapéutico eficaz para prevenir el cáncer de mama sensible a progastrina incluido, por ejemplo, un anticuerpo que tiene especificidad por una sustancia diferente a la progastrina.

50 También se proporcionan procedimientos para inhibir el crecimiento de células madre del cáncer de mama sensible a progastrina en un paciente mediante la administración a un paciente con necesidad de inhibición del crecimiento de células madre del cáncer de mama sensible a progastrina de una composición que comprende un anticuerpo que se une específicamente a progastrina en una cantidad eficaz para inhibir dichas células madre del cáncer de mama sensible a progastrina.

60 En una serie de formas de realización, los anticuerpos de la composición son eficaces para reducir la proliferación o aumentar la tasa de muerte celular de células madre del cáncer de mama sensible a progastrina, o reducir la concentración de progastrina en sangre en pacientes tratados. En otras formas de realización, la composición puede administrarse concurrentemente o después de un segundo agente terapéutico eficaz para inhibir el crecimiento de células madre del cáncer de mama sensible a progastrina, por ejemplo, un anticuerpo que tiene especificidad por una sustancia diferente a la progastrina.

65 También se proporcionan procedimientos para realizar un seguimiento de la eficacia de un tratamiento contra el

5 cáncer de mama sensible a progastrina en un paciente, tal como quimioterapia, tratamiento biológico, inmunoterapia o tratamiento con anticuerpos, determinando la concentración de progastrina en una primera muestra, tal como un fluido corporal o una biopsia de cáncer de mama, obtenida de un paciente después de un tratamiento contra el cáncer de mama, y después comparando la concentración de progastrina en la primera muestra con la de una segunda muestra obtenida del mismo paciente, indicando una reducción en la concentración de progastrina en dicha segunda muestra en comparación con dicha primera muestra que el tratamiento ha sido eficaz.

10 En algunas formas de realización del procedimiento, la segunda muestra se obtiene antes de que el paciente se trate del cáncer de mama, o después del tratamiento, pero antes de obtener la primera muestra. En otras formas de realización, se utiliza un ensayo, tal como RIA o ELISA, utilizando un anticuerpo específico para progastrina, para determinar la concentración de progastrina en la primera muestra.

15 También se proporcionan procedimientos para diagnosticar la presencia de cáncer de mama en un paciente determinando la concentración de progastrina en una muestra, tal como un fluido corporal, obtenida de un paciente sospechoso de padecer cáncer de mama y después comparando la concentración de progastrina en la muestra con un valor predeterminado, en los que un nivel elevado de progastrina en la muestra en comparación con el valor predeterminado indica la presencia de cáncer de mama en el paciente. En algunas formas de realización, el valor predeterminado se basa en un promedio de valores de muestras obtenidas cuando se sabía que el paciente no padecía cáncer de mama y en otras el valor predeterminado se basa en un promedio de la población.

20 En algunas formas de realización del procedimiento, el paciente se trató previamente de cáncer de mama y se encuentra en remisión en el momento de obtener la muestra. En otras formas de realización, el procedimiento incluye la etapa adicional de realizar una segunda prueba de diagnóstico en el paciente para confirmar la presencia de cáncer de mama que incluye, por ejemplo, un análisis de sangre, una prueba imagenológica médica o un estudio genético. En algunas formas de realización, la prueba imagenológica médica es una mamografía y en otras formas de realización el estudio genético consiste en detectar mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2. En otras formas de realización más, se utiliza un ensayo tal como RIA o ELISA utilizando un anticuerpo específico para progastrina para determinar la concentración de progastrina en la muestra.

25 Las composiciones de anticuerpos para su utilización en los procedimientos anteriores pueden administrarse utilizando una serie de vías diferentes, tales como la vía intravenosa, y diferentes procedimientos, tales como mediante infusión o mediante inyección en embolada. La dosis de anticuerpos puede variar a lo largo de un intervalo amplio, en función de la naturaleza y la necesidad del sujeto que se va a tratar. La dosis puede administrarse en una sesión o a lo largo de múltiples sesiones espaciadas.

30 En los procedimientos pueden utilizarse diferentes tipos de anticuerpos anti-hPG que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (que pueden estar humanizados), así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos que tienen los isotipos de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM, y anticuerpos monocatenarios. En algunas otras formas de realización, los anticuerpos están conjugados a restos que alteran positivamente su función o sus características, por ejemplo aumentando su semivida en suero. En otras formas de realización más, pueden efectuarse cambios de aminoácidos con un fin similar, o con otros fines. La afinidad del anticuerpo por la progastrina puede variar ampliamente siempre que se mantenga la eficacia terapéutica. En algunas formas de realización, los anticuerpos reconocen solo un epítipo de progastrina. En otras formas de realización pueden utilizarse mezclas de anticuerpos específicos para diferentes epítopos de progastrina.

35 También se proporcionan kits para facilitar la administración de composiciones de anticuerpos anti-progastrina a pacientes. En algunas formas de realización, los kits incluyen un anticuerpo anti-progastrina, o bien en forma liofilizada o bien como solución acuosa, un diluyente, tal como agua de grado farmacéutico o un tampón, y un dispositivo de administración del anticuerpo anti-progastrina, tal como una jeringa y una aguja. En otras formas de realización, los kits pueden incluir adicionalmente un segundo agente terapéutico, tal como, pero sin limitación, un agente quimioterápico tal como uno de la divulgación, o cualquier otro.

40 Los anticuerpos para su utilización en los procedimientos de tratamiento contra el cáncer de mama sensible a progastrina pueden presentar un intervalo de afinidades de unión por la progastrina, por ejemplo, aproximadamente 5000 nM, o incluso superior, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 4000 nM, 3000 nM, 2000 nM, 1000 nM, 900 nM, 800 nM, 700 nM, 600 nM, 500 nM, 400 nM, 300 nM, 200 nM, 100 nM, 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM o 0,001 nM.

45 En determinadas formas de realización de los procedimientos divulgados, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales tales como los que se divulgan en la presente memoria que incluyen, por ejemplo, MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19, MAb20, MAb21, MAb22, MAb23, o cualquier otro.

En otras formas de realización de los procedimientos divulgados pueden utilizarse anticuerpos monoclonales tales como los que se divulgan en la presente memoria que incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales que tengan una región variable de cadena pesada (VH) en la que la primera CDR se selecciona de entre VH CDR 1.3, VH CDR 1.4, VH CDR 1.8, VH CDR 1.13, VH CDR 1.16, VH CDR 1.19, la segunda CDR se selecciona de entre VH CDR 2.3, VH CDR 2.4, VH CDR 2.8, VH CDR 2.13, VH CDR 2.16, VH CDR 2.19 y la tercera CDR se selecciona de entre VH CDR 3.3, VH CDR 3.4, VH CDR 3.8, VH CDR 3.13, VH CDR 3.16, VH CDR 3.19. Las secuencias particulares de estas CDR se describen más adelante. Otros anticuerpos útiles tienen una región de cadena ligera (VL) en los que la primera CDR se selecciona de entre VL CDR 1.3, VL CDR 1.4, VL CDR 1.8, VL CDR 1.13, VL CDR 1.16, VL CDR 1.19, la segunda CDR se selecciona de entre VL CDR 2.3, VL CDR 2.4, VL CDR 2.8, VL CDR 2.13, VL CDR 2.16, VL CDR 2.19 y la tercera CDR se selecciona de entre VL CDR 3.3, VL CDR 3.4, VL CDR 3.8, VL CDR 3.13, VL CDR 3.16, VL CDR 3.19. Las secuencias particulares de estas CDR se describen también más adelante.

15 Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona un gráfico que compara los niveles de expresión del gen de la gastrina entre tres estirpes celulares de cáncer de mama metastásico humanas con respecto a células SW480.

20 La figura 2 proporciona un gráfico que compara los niveles de expresión del gen de la gastrina relativos en tumores de mama primarios de diferentes pacientes.

La figura 3 proporciona un gráfico que compara los niveles de expresión del gen de la gastrina relativos en tumores de mama metastásicos de diferentes pacientes.

25 La figura 4 proporciona un gráfico que muestra concentraciones de progastrina en sangre en pacientes con cáncer de mama metastásico a los que se extirpó el tumor primario en comparación con controles sanos.

30 La figura 5 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos policlonales de control y anti-hPG sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 en cultivo.

La figura 6 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos monoclonales de control y anti-hPG MAb3 y MAb8 sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 en cultivo.

35 La figura 7 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos monoclonales de control y anti-hPG MAb8, MAb13, MAb16 y MAb19 sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 en cultivo.

40 La figura 8 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos monoclonales de control y anti-hPG sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MCF-7 en cultivo.

La figura 9 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos monoclonales de control y anti-hPG sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico T47D en cultivo.

45 La figura 10 proporciona un gráfico que compara la cantidad relativa de la expresión del gen de la gastrina asociada con el cultivo de dos estirpes celulares de cáncer de mama metastásico diferentes en condiciones normales de cultivo tisular y en condiciones de cultivo de baja adherencia.

50 La figura 11 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos monoclonales de control y anti-hPG MAb8 sobre el crecimiento como esferoides de células de cáncer de mama metastásico MCF-7 en condiciones de cultivo de baja adherencia.

55 La figura 12 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos monoclonales de control y anti-hPG MAb3 sobre el crecimiento como esferoides de células de cáncer de mama metastásico MCF-7 en condiciones de cultivo de baja adherencia.

60 La figura 13 proporciona secuencias de aminoácidos de preprogastrina humana (SEC ID n°: 100), en las que la secuencia peptídica señal está subrayada, progastrina humana madura (SEC ID n°: 101) y determinados productos del procesamiento de la progastrina, que incluyen G34 (SEC ID n°: 102), G34-Gly (SEC ID n°: 103), G17 (SEC ID n°: 104), G17-Gly (SEC ID n°: 105) y CTFP (SEC ID n°: 106).

65 La figura 14 proporciona secuencias de polinucleótidos y de aminoácidos de las cadenas ligera variable y pesada variable de determinados anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplificativos. En cada caso, las tres CDR se muestran en texto en negrita y subrayado. Específicamente:

La figura 14A proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb3 anti-hPG murino (SEC ID

- nº: 12) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 16);
- 5 La figura 14B proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb3 anti-hPG murino (SEC ID nº: 13) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 17);
- La figura 14C proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb4 anti-hPG murino (SEC ID nº: 14) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 18);
- 10 La figura 14D proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb4 anti-hPG murino (SEC ID nº: 15) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 19);
- La figura 14E proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb8 anti-hPG murino (SEC ID nº: 59) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 67);
- 15 La figura 14F proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb8 anti-hPG murino (SEC ID nº: 63) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 71);
- La figura 14G proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb13 anti-hPG murino (SEC ID nº: 60) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 68);
- 20 La figura 14H proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb13 anti-hPG murino (SEC ID nº: 64) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 72);
- La figura 14I proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb16 anti-hPG murino (SEC ID nº: 61) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 69);
- 25 La figura 14J proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb16 anti-hPG murino (SEC ID nº: 65) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 73);
- La figura 14K proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb19 anti-hPG murino (SEC ID nº: 62) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 70);
- 30 La figura 14L proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb19 anti-hPG murino (SEC ID nº: 66) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 74);
- 35 La figura 15 proporciona secuencias de polipéptidos proyectadas para las cadenas pesada y ligera variables humanizadas de anticuerpos monoclonales anti-hPG seleccionados descritos en la presente memoria. En cada caso, las tres CDR se muestran en texto en negrita y subrayado. Específicamente:
- 40 La figura 15A proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb3 humanizado (SEC ID nº: 21);
- La figura 15B proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb3 humanizado (SEC ID nº: 22);
- 45 La figura 15C proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb4 humanizado (SEC ID nº: 23);
- La figura 15D proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb4 humanizado (SEC ID nº: 24);
- 50 La figura 15E proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb8(a) humanizado (SEC ID nº: 75);
- 55 La figura 15F proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(a) humanizado (SEC ID nº: 76);
- La figura 15G proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb8(b) humanizado (SEC ID nº: 77);
- 60 La figura 15H proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(b) humanizado (SEC ID nº: 78);
- 65 La figura 15I proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb8(c) humanizado (SEC ID nº: 79);

- La figura 15J proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(c) humanizado (SEC ID n°: 76);
- 5 La figura 15K proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb13(a) humanizado (SEC ID n°: 80);
- La figura 15L proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb13(a) humanizado (SEC ID n°: 81);
- 10 La figura 15M proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb13(b) humanizado (SEC ID n°: 82);
- La figura 15N proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb13(b) humanizado (SEC ID n°: 83);
- 15 La figura 15O proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb16(a) humanizado (SEC ID n°: 84);
- La figura 15P proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(a) humanizado (SEC ID n°: 85);
- 20 La figura 15Q proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb16(b) humanizado (SEC ID n°: 86);
- La figura 15R proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(b) humanizado (SEC ID n°: 87);
- 25 La figura 15S proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb16(c) humanizado (SEC ID n°: 88);
- 30 La figura 15T proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(c) humanizado (SEC ID n°: 89);
- La figura 15U proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb19(a) humanizado (SEC ID n°: 90);
- 35 La figura 15V proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(a) humanizado (SEC ID n°: 91);
- La figura 15W proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb19(b) humanizado (SEC ID n°: 92);
- 40 La figura 15X proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(b) humanizado (SEC ID n°: 93);
- 45 La figura 15Y proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb19(c) humanizado (SEC ID n°: 94); y
- La figura 15Z proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(c) humanizado (SEC ID n°: 95).
- 50

Descripción detallada

1. Cáncer de mama

55 La mayor parte de los cánceres de la mama en mujeres comienzan en las células que recubren los conductos que sirven para transportar leche desde las glándulas o los lóbulos productores de leche. Dichos cánceres de mama se denominan cánceres ductales. Otros cánceres de mama comienzan en las células que recubren los lóbulos, los denominados cánceres lobulares. Una minoría de los cánceres de mama comienzan en otros tejidos

60 que comprende la mama, incluido el estroma, que es el tejido graso y conectivo que rodea los conductos y los lóbulos, los vasos linfáticos y los vasos sanguíneos.

Casi todos los cánceres de mama son carcinomas que comienzan en célula epiteliales que recubren los conductos o los lóbulos. Dichos cánceres se conocen como carcinoma ductal y carcinoma lobular, respectivamente. El cáncer de mama también puede iniciarse como un sarcoma, que se forma en el tejido conectivo de la mama, incluidos músculo, grasa o vasos sanguíneos.

65

Los tipos particulares de cáncer de mama incluyen, pero sin estar limitados necesariamente a los mismos, carcinoma ductal in situ, carcinoma lobular in situ, carcinoma ductal invasivo (o infiltrante), carcinoma lobular invasivo (o infiltrante). Los tipos de cáncer de mama menos comunes incluyen cáncer de mama inflamatorio, 5
cáncer de mama triple negativo, tumores mixtos, carcinoma medular, carcinoma metaplásico, carcinoma mucinoso, enfermedad de Paget del pezón, carcinoma tubular, carcinoma papilar, carcinoma quístico adenoide (carcinoma adenoquístico), tumor filoides y angiosarcoma.

2. Metástasis del cáncer de mama

La metástasis se refiere a un proceso mediante el cual el cáncer se expande. En síntesis, las células tumorales abandonan el tumor primario, se propagan a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático a un nuevo tejido y forman un tumor secundario. Los tumores en el nuevo tejido se denominan tumores metastásicos y normalmente identifican la fuente del tumor primario. Por ejemplo, el cáncer de mama que se ha extendido a 15
otros tejidos se denomina "cáncer de mama metastásico", pese al tejido de ubicación del tumor metastásico secundario. Los órganos más comunes a los que se metastatiza el cáncer de mama son los huesos, los pulmones, el hígado o el cerebro, pero el cáncer de mama también puede extenderse a otros órganos.

Las células del cáncer se extienden frecuentemente a ganglios linfáticos cercanos al tumor primario, lo que se denomina afectación de ganglios linfáticos o enfermedad regional.

Sin desear limitarse a ninguna teoría de operación particular, se piensa que la metástasis consiste en una serie de distintas etapas: invasión y migración, intravasación, circulación, extravasación y colonización, proliferación y angiogénesis. Durante la invasión y la migración, las células individuales se desprenden por sí mismas del tumor primario e invaden tejido sano adyacente. Para realizar esto, las células cancerosas deben volverse móviles, y se ha formulado la hipótesis de que experimentan una transformación fenotípica, denominada transición epitelial a mesenquimal, que lo facilita. Kalluri, R., *et al.*, J. Clin. Invest., 119(6) (2009), 1420-28. Dichas células pueden producir enzimas que degradan la matriz extracelular, facilitando de esta forma la migración fuera del tumor primario y el tejido sano circundante. Cuando una célula cancerosa encuentra un vaso sanguíneo o linfático, se inserta en el mismo entre las células endoteliales que recubren los vasos y penetra en el torrente sanguíneo o en el sistema linfático. La célula aberrante se propaga después a través del sistema circulatorio o del sistema linfático a un nuevo órgano o a un ganglio linfático. La célula cancerosa puede alojarse después en los capilares o los vasos linfáticos de un órgano, tal como el hígado, el pulmón u otros tejidos u órganos, y después se extravasa penetrando a través del endotelio en el espacio tisular. Finalmente, durante la colonización, la proliferación y la angiogénesis, las células neoplásicas comienzan a residir en su nuevo tejido huésped y comienzan a crecer. Cuando el nuevo tumor metastásico alcanza un tamaño suficiente, puede segregar factores de crecimiento, tales como VEGF, para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el tumor, a fin de suministrar oxígeno y nutrición al tumor en rápido crecimiento.

3. Recurrencia del cáncer de mama

La recurrencia del cáncer de mama se define como la reaparición del cáncer de mama después de un tratamiento que aparentemente ha provocado que desaparezca el cáncer de mama. Si el cáncer de mama que reaparece se encuentra en el mismo sitio que el cáncer original o muy cercano al mismo (por ejemplo, en la misma mama o cerca de la cicatriz de mastectomía), se conoce como recurrencia local. El cáncer que se encuentra en la otra mama no es una recurrencia y se considera que es un nuevo cáncer. Cuando el cáncer de mama que reaparece crece en ganglios linfáticos o tejidos cercanos a la ubicación del cáncer original se conoce como recurrencia regional, y cuando el cáncer de mama que reaparece se metastatiza a órganos o tejidos alejados de la ubicación del cáncer original, se conoce como recurrencia distante.

4. Células madre del cáncer y cáncer de mama

Los tumores sólidos no son necesariamente tejidos homogéneos. Más bien algunos tumores comprenden una pluralidad de tipos celulares aberrantes que tienen distintas propiedades fenotípicas y funcionales. A este respecto, dichos tumores son análogos a órganos anormales. Una diferencia importante entre las células que comprenden tumores sólidos es la medida en la que son capaces de iniciar la formación de un nuevo tumor cuando se trasplantan a una nueva ubicación del mismo huésped, o a un nuevo huésped de la misma o de diferente especie. Las células que tienen esta propiedad se conocen como células iniciadoras de tumor o de cáncer, o alternativamente, células madre tumorales o cancerosas. Por el contrario, otras células que comprenden el tumor tienen un potencial mucho más reducido de iniciar nuevos tumores después de un trasplante, incluso cuando se utilizan muchas más células. En un ejemplo no limitativo, una cantidad de células 100 veces inferior derivadas de una línea celular del cáncer de mama que tenían un fenotipo de célula madre del cáncer fueron capaces de formar nuevos tumores en ratones en comparación con células de la misma línea celular que carecían del fenotipo de célula madre. Gupta, P.B., *et al.*, "Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening" Cell, 13864-659 (2009). Véase también, Filmore, C.M. y C. Kuperwasser, "Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and

survive chemotherapy," Br. Cancer Res., 10:R25 (2008).

En muchos tumores, las células madre del cáncer comprenden una proporción relativamente pequeña de todas las células viables existentes en el tumor. Por el contrario, la mayor parte de las células tumorales que comprende la masa tumoral son incapaces de iniciar un nuevo tumor cuando se trasplantan. En algunos tumores, sin embargo, las células madre del cáncer pueden constituir la mayor parte, o incluso la totalidad, de las células que comprende el tumor. Tal como se utiliza el presente documento, células de masa tumoral se refiere a células tumorales incapaces de iniciar nuevos tumores después del trasplante, a menos que se utilice un gran número de dichas células. Las células madre del cáncer también tienen características fenotípicas diferentes a las células de masa tumoral que incluyen la capacidad de autorrenovarse y formar un nuevo tumor después del trasplante de una cantidad relativamente pequeña de células madre del cáncer y la expresión de diferentes marcadores detectables por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) u otros ensayos. Otras distinciones entre células madre del cáncer y células de masa tumoral son también posibles.

Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se cree que las células madre del cáncer comparten determinadas propiedades con células madre normales que en el contexto de células madre del cáncer contribuyen a su capacidad para dar lugar a tumores. En particular, las células madre del cáncer experimentan división celular asimétrica para producir dos tipos de células hijas. La primera permanece sin diferenciar y conserva las características de célula madre de su célula parental de ser capaz de renovarse por sí misma indefinidamente. La otra hija, denominada una célula progenitora, es capaz de dividirse y diferenciarse, aunque de forma aberrante, dando lugar al espectro de células más diferenciadas encontrado en muchos tumores sólidos. Las células progenitoras proliferan a una velocidad superior que las células madre y contribuyen, por lo tanto, al crecimiento físico del tumor, mientras que las células madre son responsables de la capacidad del tumor para crecer indefinidamente generando nuevas progenitoras.

Estas propiedades permiten que las células madre del cáncer den lugar en último lugar al gran número de células que comprende el tumor en crecimiento. Por lo tanto, cuando se trasplantan a un nuevo animal, las células madre del cáncer pueden reconstituir el tipo de tumor del que se originan, incluso después de múltiples trasplantes seriados. Las células madre del cáncer, a diferencia de las células madre normales, alojan mutaciones genéticas y/o cambios epigenéticos que pueden dar como resultado patrones de proliferación alterados y/o tasas de apoptosis reducidas, y dar como resultado una diferenciación aberrante que causa la acumulación de las células anormales que pueden constituir la masa del tumor.

Las células madre del cáncer pueden identificarse según una serie de características fenotípicas que las distinguen de las células de masa tumoral. En primer lugar, como se ha indicado anteriormente, las células madre del cáncer tienen la capacidad de iniciar un nuevo tumor cuando se trasplantan a un nuevo huésped. Por el contrario, las células de masa tumoral son o bien incapaces de iniciar nuevos tumores o bien requieren muchas más células que las células madre del cáncer para lograr la iniciación de nuevos tumores. Las células madre del cáncer se pueden identificar también por su expresión o no expresión de determinados marcadores, mientras que las células de masa tumoral procedentes del mismo tumor tienen patrones diferentes de expresión de marcadores. Las células madre del cáncer también tienen una capacidad preferencial, en comparación con las células de masa tumoral, para crecer en condiciones de cultivo carentes de suero y de baja adherencia y formar los denominados esferoides. Otras diferencias fenotípicas capaces de distinguir células madre del cáncer de células de masa tumoral son posibles.

Como se ha indicado anteriormente, también pueden identificarse células madre del cáncer según los patrones de expresión de determinados marcadores, solos o en combinación con otros. Las células madre del cáncer de diferentes tumores, no obstante, pueden presentar diferentes fenotipos de marcadores. Dichos marcadores incluyen proteínas expresadas dentro de la célula, o en la superficie celular, y pueden detectarse utilizando una diversidad de técnicas que incluyen, pero sin limitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y análisis FACS. También son posibles otras técnicas para detectar marcadores de acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia. Los marcadores también incluyen proteínas cuya actividad pueda analizarse de forma funcional en células madre del cáncer. Ejemplos no limitativos de tipos de marcadores incluyen proteínas transportadoras, tales como las que exportan sustancias desde las células o absorben sustancias al interior de las células, enzimas, tales como enzimas detoxificantes.

Los marcadores ejemplificativos que pueden utilizarse para identificar células madre del cáncer de mama incluyen, pero sin limitación: CD44, CD24 y ESA. También son posibles otros marcadores útiles para identificar células madre del cáncer. En algunas formas de realización, la ausencia de expresión de un marcador es indicativa del fenotipo de célula madre del cáncer. En algunas formas de realización de la presente divulgación pueden identificarse células madre del cáncer de mama por medio de los siguientes fenotipos de marcadores, utilizando FACS u otras técnicas familiares para los expertos en la materia: CD44(+)/CD24(-), CD44(+)/CD24(bajo) y CD44(+)/CD24(-)/ESA(+). La expresión de otros marcadores, y las combinaciones y patrones de los mismos, también pueden utilizarse para identificar células madre del cáncer en estos cánceres, así como otros tipos de cáncer. En otras formas de realización de la presente divulgación, pueden identificarse células madre del cáncer de mama utilizando análisis FACS dado que clasifica estas células en las denominadas

población lateral (“side population”) según su capacidad preferencial para excluir determinados colorantes. Un ejemplo no limitativo de dicho colorante es el colorante Hoechst 33342.

5 Como se ha mencionado anteriormente también pueden distinguirse células madre del cáncer de células de masa tumoral por su capacidad aumentada para iniciar el crecimiento de un nuevo tumor después de su trasplante a un nuevo huésped. Así, una forma de confirmar la identidad de una población de células sospechosa de ser células madre del cáncer es analizar su capacidad para iniciar el crecimiento de un tumor después de su trasplante a un animal receptor no humano.

10 Los procedimientos de trasplante útiles para evaluar si un tumor o una línea celular contiene células madre del cáncer son familiares para los expertos en la materia. Como ejemplo no limitativo, se aísla un tumor, o una porción del mismo, sospechoso de contener células madre del cáncer, por ejemplo mediante extirpación quirúrgica. A continuación el tejido tumoral se tritura y se trata con enzimas, o se somete a algún otro tratamiento eficaz para desagregar el tumor y liberar sus células constituyentes. Como alternativa, cuando se está
15 analizando una línea celular, puede ser necesario únicamente disociar las células con tratamiento enzimático o químico.

Después de preparar una suspensión celular, las células se recogen por centrifugación y las subpoblaciones que se sabe que corresponden a células madre del cáncer se aíslan según procedimientos conocidos en la técnica.
20 Como se ha indicado anteriormente, en un ejemplo no limitativo, dichas células expresan determinados patrones o marcadores indicativos de células madre del cáncer que pueden detectarse utilizando anticuerpos específicos y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En otras formas de realización, las subpoblaciones sospechosas de contener células madre del cáncer pueden aislarse según otras características fenotípicas, tales como su capacidad para excluir determinados colorantes

25 Después de aislar las subpoblaciones celulares relevantes, se implantan a continuación cantidades predeterminadas de dichas células en uno o más tejidos u órganos en un animal receptor. En algunas formas de realización, el animal receptor es un ratón inmunodeficiente, incluidos, pero sin limitación, ratones atímicos, ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y ratones diabéticos no obesos SCID (NOD-SCID).
30 También pueden utilizarse otras especies, de acuerdo con los conocimientos del experto.

Las células pueden implantarse subcutáneamente, en almohadillas de grasa (tales como las almohadillas de grasa mamarias de ratones), en el cerebro, el páncreas o el hígado, o en el riñón (como por ejemplo en la cápsula renal). Las células pueden implantarse también en otros tejidos u órganos. En algunas formas de
35 realización, el tejido u órgano diana se elige de forma que replique el tejido u órgano de origen del tumor que se está analizando. Sin embargo, en otras formas de realización, se eligen tejidos u órganos distintos en los que alojar las células implantadas. Como ejemplo no limitativo, pueden trasplantarse células madre del cáncer de colon en la cápsula renal de un ratón NOD-SCID para evaluar su capacidad para iniciar un nuevo tumor.

40 Después del implante, que se efectúa utilizando técnicas familiares para los expertos, las células se mantienen sin perturbarlas para determinar si crece un nuevo tumor en la ubicación del implante. Para células implantadas subcutáneamente, el crecimiento del tumor puede evaluarse mediante examen visual y palpación del sitio del implante. Si un tumor crece, su tamaño puede medirse a lo largo del tiempo utilizando calibres. Para células
45 implantadas en un órgano interno, el animal puede sacrificarse en un momento predeterminado después del implante para determinar si hay presencia de un tumor, y si es así, su tamaño. Como alternativa, de acuerdo con los conocimientos del experto, pueden aplicarse técnicas no invasivas para evaluar el crecimiento del tumor.

El fenotipo de célula madre del cáncer también se caracteriza por la capacidad preferencial de las células madre del cáncer de crecer como esferoides en condiciones de cultivo carentes de suero y de baja adherencia, mientras que es menos probable que las células de masa tumoral crezcan como esferoides en las mismas condiciones. Los esferoides son bolas compactas de células que se forman al crecer determinadas células en cultivo después de haberlas sembrado como suspensiones desagregadas. La formación de dichos esferoides se promueve cuando las células se cultivan en medio carente de suero (por ejemplo, MammoCult®, disponible de StemCell Technologies, Inc., Vancouver, Canadá), generalmente en presencia de factores del crecimiento específicos
55 (incluidos, pero sin limitación, el factor del crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)), y en placas de cultivo tisular que tienen superficies a las que se adhieren deficientemente células de mamífero. De forma similar a las células madre de tejidos normales, se ha descubierto que las células madre del cáncer crecen preferentemente como esferoides en las condiciones de cultivo apropiadas. Véase, por ejemplo, Rappa, G., *et al.*, Exp. Cell Res., 314:2110 (2008); Singh, S.K., *et al.*, Cancer Res., 63:5821 (2003); Fang, D., *et al.*, Cancer Res., 65:9328 (2005). Por el contrario, las células de masa tumoral, que tienden a diferenciarse mucho más, es menos probable que formen esferoides en las mismas condiciones de cultivo. Cuando las células de masa tumoral son capaces de forma esferoides, estos tienden a ser más pequeños y/o
60 menores en número en comparación con los formados por un número similar de células madre del cáncer.

5. Células madre del cáncer y recurrencia del cáncer de mama

Se ha identificado que las células tumorales con propiedades de células madre del cáncer muestran una resistencia mejorada a la radiación y/o a agentes quimioterápicos. Se han propuesto diferentes mecanismos moleculares para explicar la resistencia de células madre del cáncer a la radiación o a agentes quimioterápicos. Por ejemplo, se ha informado que determinadas células madre del cáncer pueden ser capaces de reparar más fácilmente sus ADN después de una agresión genotóxica, mientras que otras células madre del cáncer expresan niveles elevados de proteínas antiapoptóticas o de bombas moleculares eficaces en eliminar agentes quimioterápicos que penetran en dichas células. Eyler, C.E. y J.N. Rich, J. Clin. Oncol., 26:2839-2845 (2008). El que las células madre del cáncer proliferen más lentamente que las células progenitoras también puede explicar la capacidad comparativa de las células madre de sobrevivir a la exposición a radiación y a agentes quimioterápicos tóxicos que destruirían las células de masa tumoral.

Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, la observación de que las células madre del cáncer son resistentes a la radiación y a la quimioterapia puede explicar el fenómeno de recurrencia en pacientes con cáncer tratados con dichos tratamientos. Eyler, *supra*. En dichos pacientes, el tratamiento es inicialmente eficaz, haciendo que los tumores se encojan o desaparezcan en barridos de diagnóstico, pero los tumores reaparecen algún tiempo después de cesar el tratamiento.

Con respecto al papel de las células madre del cáncer en el mecanismo de recurrencia, se ha formulado la hipótesis de que mientras la mayor parte o incluso todas las células de masa tumoral se destruyen con el tratamiento, permanecen un número de células madre del cáncer viables que sobreviven gracias a su capacidad mejorada para resistir los efectos de la radiación o de la quimioterapia. Una vez ha concluido el tratamiento, estas células supervivientes continúan creciendo, permitiendo la reformación del tumor original o la formación de nuevos tumores.

En consecuencia con esta teoría, se ha informado que el tratamiento de ratones a los que se ha trasplantado una línea celular de cáncer de mama humana con un agente quimioterápico fue eficaz para seleccionar y enriquecer la proporción de células de los tumores que tenían características de células madre del cáncer. Yu, F., *et al.*, 2007, "let-7 Regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells", Cell 131:1109-23.

La observación de que las células madre del cáncer de mama son resistentes tanto a la radiación como a agentes quimioterápicos sugiere que dichas células son responsables de la recurrencia del cáncer de mama. Phillips, T.M., *et al.*, "The response of CD24-/low/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation," J. Natl. Canc. Inst., 98(24):1777-1785 (2006), Gupta, P.B., *et al.*, y Filmore, C.M. y C. Kuperwasser, *supra*.

6. Avances en el entendimiento del papel de la progastrina en el cáncer de mama

Como se describe con más detalle en los ejemplos, los solicitantes han descubierto, sorprendentemente, que el gen de la gastrina (GAST) se expresa en tres estirpes celulares de cáncer de mama metastásico humano, células MCF-7, células MDA-MB231 y células T47D, a niveles variables en comparación con las estirpes celulares de control. Con respecto a los datos de los experimentos *in vitro*, los solicitantes han descubierto también, sorprendentemente, que el gen de la gastrina se expresa a niveles variables en 27 de 150 cánceres de mama primarios y en 7 de 25 cánceres de mama metastásicos obtenidos de pacientes con cáncer de mama humanos.

Debido a que la progastrina es un producto del gen de la gastrina (junto con otros péptidos procesados postraducionalmente del mismo producto génico), los datos de los estudios de la expresión del gen de la gastrina *in vitro* e *in vivo* sugieren que algunos, pero no todos los cánceres de mama primarios y metastásicos segregan la proteína progastrina. La confirmación con respecto al cáncer de mama metastásico proviene de la observación por parte de los solicitantes de que la mediana del nivel en sangre de PG entre pacientes a los que se había diagnosticado cáncer de mama metastásico a los que se les habían extirpado tumores primarios era más elevada en comparación con la del nivel en la sangre de controles sanos. Por lo tanto, el cáncer de mama metastásico segrega PG que puede detectarse en la sangre. También se detectaron niveles de PG más elevados de lo normal en la sangre de determinados pacientes a los que se diagnosticó cáncer de mama primario. Son posibles, por lo tanto, pruebas de diagnóstico para detectar la presencia de cáncer de mama en pacientes comparando el nivel de PG en sangre en un paciente sospechoso de padecer cáncer de mama con el nivel de PG en sangre en pacientes sanos sin cáncer. Los niveles de PG en plasma y/o suero sanguíneo pueden detectarse utilizando anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes de la presente divulgación, utilizando técnicas tales como, pero sin limitación, RIA o ELISA. Un diagnóstico provisional de cáncer de mama basado en niveles superiores a lo normal de PG en sangre puede confirmarse después utilizando otras pruebas, tales como una prueba imagenológica médica, por ejemplo, CT o MRI.

Los solicitantes han descubierto también, sorprendentemente, que el crecimiento en cultivo de determinadas estirpes celulares de cáncer de mama metastásico humanas, por ejemplo, células MCF-7 y células MDA-MB-231, se inhibe mediante el tratamiento con anticuerpos policlonales y/o monoclonales que reconocen

específicamente la hPG. Los experimentos realizados utilizando células MDA-MB-231 demostraron que el efecto inhibitor utilizando anticuerpo monoclonal anti-hPG era sensible a la dosis y que el efecto inhibitor podía mediarse por anticuerpos que reconocen tanto el extremo N-terminal como el extremo C-terminal de la progastrina. Por el contrario, el tratamiento de la línea celular de cáncer de mama metastásico humana T47D con un anticuerpo monoclonal contra hPG no afectó significativamente al crecimiento de dichas células. Se interpreta que estos sorprendentes descubrimientos significan que algunas, pero no todas las células del cáncer de mama metastásico son sensibles a PG y que el crecimiento de dichas células puede inhibirse mediante el tratamiento con anticuerpos anti-hPG neutralizantes.

Una célula de cáncer de mama sensible a PG es una que depende, al menos parcialmente, de progastrina para su supervivencia y/o su crecimiento, directamente o indirectamente. Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se ha planteado la hipótesis de que los anticuerpos anti-hPG neutralizantes son eficaces en inhibir la supervivencia y/o el crecimiento de dichas células uniéndose a la PG y bloqueando la señalización dependiente de PG. Por lo tanto, se evita que la progastrina medie en su supervivencia y/o en efectos promotores del crecimiento. Pueden existir otros mecanismos mediante los cuales los anticuerpos anti-PG inhiban la supervivencia y/o el crecimiento de células de cáncer de mama.

Sobre la base de la observación de que anticuerpos neutralizantes contra la hPG pueden inhibir el crecimiento de determinadas células de cáncer de mama metastásico humanas, son posibles procedimientos de tratamiento de cáncer de mama metastásico sensible a PG administrando cantidades terapéuticamente eficaces de anticuerpos anti-hPG neutralizantes a pacientes con necesidad de tratamiento de cáncer de mama metastásico.

Otros experimentos llevados a cabo por los solicitantes demostraron, sorprendentemente, que el cáncer de mama metastásico contiene células madre del cáncer de mama sensibles a PG que pueden ser inhibidas mediante tratamiento con anticuerpos anti-hPG neutralizantes. En particular, los solicitantes encontraron que aproximadamente el 95% de células MDA-MB-231 expresaron un marcador fenotípico, CD44+/CD24-, que las identifica como células madre del cáncer de mama (experimento no mostrado). Debido a que las células MDA-MB-231 son sensibles a PG y casi todas estas células expresan marcadores de células madre de cáncer de mama, es probable que las células madre sean sensibles a PG. De forma consecuente con ello, las células T47D, que se encontró que no eran sensibles a PG, no contenían células que expresaban CD44+/CD24- (experimento no mostrado), mientras que se descubrió que las células MCF-7, de las que se informó que contenían aproximadamente el 1,6% de células CD44+/CD24- (Phillips, *et al.*, anteriormente) eran sensibles al efecto inhibitor del crecimiento de un anticuerpo anti-hPG.

Apoyando la conclusión de que determinadas células madre de cáncer de mama son sensibles a PG se encuentra la observación de que la expresión del gen de la gastrina en células MDA-MB-231 aumentó cuando las células se cultivaron en condiciones de cultivo de baja adherencia que favorecían el crecimiento de células madre del cáncer. La expresión del gen de la gastrina disminuyó en células MCF-7, sin embargo, cuando se cultivaron en condiciones de baja adherencia, aunque el efecto sobre la secreción de PG desde dichas células es aún desconocido.

Incluso aunque una proporción relativamente reducida de células MCF-7 exprese CD44+/CD24-, los solicitantes descubrieron un apoyo adicional a la idea de que las células madre del cáncer de mama son sensibles a PG cultivando células MCF-7 en condiciones de cultivo de baja adherencia y determinando el efecto del tratamiento con un anticuerpo específico sobre la formación de esferoides. Como se explica en los Ejemplos, el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-hPG reduce el número de esferoides en comparación con los controles. Debido a que la formación de esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia es una propiedad asociada con células madre del cáncer, estos resultados indican que las células MCF-7, como las células MDA-MB-231, contienen células madre del cáncer de mama sensible a PG cuyo crecimiento es inhibido por medio de anticuerpos neutralizantes.

Basándose en este trabajo, los solicitantes también analizaron el efecto del pretratamiento de células MCF-7 con un anticuerpo monoclonal anti-hPG diferente mientras las células se cultivaban en condiciones de cultivo convencionales, después de lo cual el anticuerpo se retiró y se dejó que las células continuaran creciendo en condiciones de baja adherencia, que se seleccionan para el crecimiento de células madre de cáncer. Los solicitantes descubrieron, sorprendentemente, que las células MCF-7 pretratadas con un anticuerpo monoclonal anti-hPG formaron menos esferoides en comparación con controles incluso aunque los anticuerpos no estuvieran presentes durante la fase de crecimiento de baja adherencia del experimento. Se interpreta que este resultado significa que las células MCF-7 contienen células madre del cáncer de mama que se inhiben por medio de un anticuerpo anti-hPG neutralizante y que el efecto inhibitor del crecimiento de dichas células madre no requiere la presencia continua de los anticuerpos.

Basándose en la observación de que determinados cánceres de mama contienen células madre del cáncer sensible a PG y de que se cree que las células madre del cáncer son responsables del fenómeno de la recurrencia del cáncer, son posibles procedimientos de prevención de la recurrencia del cáncer de mama tratando pacientes con necesidad de prevención de la recurrencia del cáncer de mama con un anticuerpo anti-

hPG neutralizante en una cantidad eficaz para prevenir la recurrencia del cáncer de mama, siendo el cáncer de mama sensible a PG. Los hallazgos sorprendentes de los solicitantes son también la base de procedimientos de prevención del crecimiento de células madre del cáncer de mama sensible a PG mediante el tratamiento de dichas células con una cantidad de un anticuerpo anti-hPG neutralizante eficaz en la inhibición del crecimiento de dichas células.

7. Anticuerpos

Los anticuerpos útiles en los procedimientos y los kits divulgados en la presente memoria son aquellos que se unen específicamente a progastrina humana y no a otros productos del gen de la gastrina. Tal como se ilustra en la figura 13, el gen de la gastrina se traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos, denominado preprogastrina, que contiene una secuencia señal (subrayada) que se escinde, dando lugar a progastrina, un polipéptido de 80 aminoácidos. La progastrina, a su vez, se escinde para generar un producto de 34 aminoácidos, que corresponde en secuencia a los residuos 38-71 de la progastrina, que se extiende después en su extremo carboxi-terminal con un residuo de glicina, generando un G34 extendido con glicina ("G34-Gly"). Un subproducto de la escisión es un péptido de 6 aminoácidos denominado el péptido flanqueante C-terminal o CTFP, que corresponde en secuencia a los residuos 75-80 de la progastrina. El G34-Gly se escinde después para generar un polipéptido de 17 residuos que corresponde en secuencia a los residuos 55-71 de la progastrina y se denomina G17-Gly. La eliminación de las glicinas C-terminales de G34-Gly y G17-Gly, seguida por la amidación C-terminal, proporciona G34 y G17, respectivamente, que se encuentran ambos amidados en sus extremos C-terminales.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo es "muy específico para" hPG o "se une de forma muy específica" a hPG si se une a progastrina de longitud completa pero no se une de ninguna forma a CTFP, a gastrina amidada o a gastrina extendida con glicina, y es "específico para" hPG o "se une específicamente a" hPG si muestra una unión por lo menos aproximadamente 5 veces superior a hPG que a CTFP y los otros productos del gen de la gastrina, medida en ensayos de unión estándar. Un ensayo ELISA específico que puede utilizarse para evaluar la especificidad de un anticuerpo anti-hPG particular se proporciona en el Ejemplo 12.

Dichos anticuerpos anti-hPG muy específicos y/o específicos (denominados en la presente memoria "anticuerpos anti-hPG") pueden ser policlonales ("PAb anti-hPG") o monoclonales ("MAb anti-hPG"), aunque para aplicaciones terapéuticas y, en algunos casos, aplicaciones de diagnóstico u otras aplicaciones *in vitro*, se prefieren anticuerpos monoclonales.

La unión al epítipo por medio de los anticuerpos anti-hPG no es crítica. Los anticuerpos anti-hPG útiles pueden unirse a una región N-terminal de la hPG, a una región C-terminal de la hPG o a una región diferente de la hPG. Recientemente se ha descubierto que, por lo menos para anticuerpos anti-hPG monoclonales, la selección del antígeno utilizado para obtener los anticuerpos anti-hPG puede ser importante (véase la solicitud internacional N° PCT/EP2010/006329, presentada el 15 de octubre de 2010 y la solicitud de Estados Unidos N° 12/906.041, presentada el 15 de octubre de 2010, que se denominan en adelante en la presente memoria las solicitudes '329 y '041, respectivamente). Como se divulga en las solicitudes '329 y '041, no todos los antígenos derivados de hPG estimulan la producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG en condiciones fisiológicas. De hecho, determinados antígenos que se han utilizado para obtener exitosamente anticuerpos anti-hPG policlonales, tales como hPG recombinante de longitud completa (véase, por ejemplo, el documento WO 08/076454 de Singh) y un péptido correspondiente a los diez últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la hPG (véase el documento WO 07/135542 de Hollande *et al.*) no consiguieron generar anticuerpos monoclonales. Como se indica en las solicitudes '329 y '041, se ha identificado que las secuencias N-terminal y C-terminal antigénicas dentro de la secuencia de hPG pueden utilizarse para generar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG. Es interesante destacar que la secuencia antigénica no precisa estar limitada a regiones de la secuencia de hPG que son únicas para ella. Los antígenos peptídicos que tienen regiones de secuencia en común con otros productos del gen de la gastrina, por ejemplo G17, G34 y CTFP, proporcionan anticuerpos monoclonales que no solo se unen a la hPG, sino que se unen a la misma específicamente.

Los anticuerpos anti-hPG que pueden obtenerse utilizando un antígeno peptídico que tiene una secuencia correspondiente a una región N-terminal de hPG y/o que se une a una región N-terminal de hPG se denominan en la presente memoria "anticuerpos anti-PG N-terminales". Una región antigénica ejemplar de hPG que puede utilizarse para construir un inmunógeno adecuado para obtener anticuerpos tanto policlonales como monoclonales específicos para hPG corresponde a los residuos 1 a 14 de hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID n°: 25). En la Tabla 1A, a continuación, y las secciones de Ejemplo se proporcionan inmunógenos ejemplificativos útiles para obtener anticuerpos anti-hPG N-terminales, así como secuencias CDR y VH y VL de anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales obtenidos con estos inmunógenos ejemplificativos:

Tabla 1A											
Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales											
Immunógeno	Hibridoma (Nº de depósito)	MAb	Secuencias de CDR murina		Secuencias de V _H y V _L murinas	Secuencias de V _H y V _L humanizadas (proyectadas)					
N1	43B9G11	MAb1									
N1	WE5H2G7	MAB2									
N2	6B5B11C10	MAB3	V _H CDR 1.3	GYFTSYW	(SEC ID nº: 1)	mV _H .3 (SEC ID nº: 12)	hV _H .3 (SEC ID nº: 21)				
			V _H CDR 2.3	FYPGNSDS	(SEC ID nº: 2)						
			V _H CDR 3.3	TRRDSPQY	(SEC ID nº: 3)						
			V _L CDR 1.3	QSIHNSGNTY	(SEC ID nº: 4)						
			V _L CDR 2.3	KVS	(SEC ID nº: 5)						
			V _L CDR 3.3	FQGSHPPT	(SEC ID nº: 6)						
N2	20D2C3G2	MAB4	V _H CDR 1.4	GYTFSSW	(SEC ID nº: 7)	mV _H .4 (SEC ID nº: 14)	hV _H .4 (SEC ID nº: 23)				
			V _H CDR 2.4	FLPGSGST	(SEC ID nº: 8)						
			V _H CDR 3.4	ATDGNIDWFAY	(SEC ID nº: 9)						
			V _L CDR 1.4	QSLVHSSGVTY	(SEC ID nº: 10)						
			V _L CDR 2.4	KVS	(SEC ID nº: 5)						
			V _L CDR 3.4	SQSTHPPT	(SEC ID nº: 11)						
			N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAB15						
			N2	1E9D9B6	MAB16			V _H CDR 1.16	GYTFTSY	(SEC ID nº: 39)	mV _H .16 (SEC ID nº: 61)
V _H CDR 2.16	INPSNGGT	(SEC ID nº: 43)									
V _H CDR 3.16	TRGGYYPFDY	(SEC ID nº: 47)									
			V _L CDR 1.16	QSLDSDGKTY	(SEC ID nº: 50)	mV _L .16 (SEC ID nº: 65)	hV _L .16a (SEC ID nº: 85)				
			V _L CDR 2.16	LVS	(SEC ID nº: 53)						
			V _L CDR 3.16	WQGTSPYT	(SEC ID nº: 57)						
N2	1C8D10F5	MAB17									
N2	1A7C3F11	MAB18									
N2	1B3B4F11	MAB19	V _H CDR 1.19	GYSITSDYA	(SEC ID nº: 40)	mV _H .19 (SEC ID nº: 62)	hV _H .19a (SEC ID nº: 90)				
			V _H CDR 2.19	ISFSGYT	(SEC ID nº: 44)						
			V _H CDR 3.19	AREVNYGDSYHFDY	(SEC ID nº: 48)		hV _H .19b (SEC ID nº: 92)				
							hV _H .19c (SEC ID nº: 94)				

			V _L CDR 1.19	SQHRITYT	(SEC ID n°: 51)	mV _L .19 (SEC ID n°: 66)	hV _L .19a (SEC ID n°: 91)
			V _L CDR 2.19	VKKDGGSH	(SEC ID n°: 54)		hV _L .19b (SEC ID n°: 93)
			V _L CDR 3.19	GVGDAIKGQSVFV	(SEC ID n°: 58)		hV _L .19c (SEC ID n°: 95)
N2	1C11F5E8	MAb20					
Inmunógeno N1 = SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-BSA, también representado como (SEC ID n°: 25)-Ahx-Cys-BSA;							
Inmunógeno N2 = SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-KLH, también representado como (SEC ID n°: 25)-Ahx-Cys-KLH							
En la tabla 1A, todas las secuencias de aminoácidos se representan utilizando orientación N→C convencional. Para cada inmunógeno, el péptido progastina se sintetizó con un enlazador C-terminal de un residuo de ácido aminohexanoico (Ahx) seguido por un residuo de cisteína (Cys), que se conjugó después o bien a un vehículo de seroalbúmina bovina ("BSA") o bien de hemocianina de lapa californiana ("KLH") por medio de un residuo enlazador de Cys.							

5 Los anticuerpos anti-hPG que pueden obtenerse utilizando un antígeno peptídico que tiene una secuencia correspondiente a una región C-terminal de hPG y/o que se une a una región C-terminal de hPG se denominan en la presente memoria "anticuerpos anti-PG C-terminales". Una región antigénica ejemplar específica que puede utilizarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos anti-hPG C-terminales tanto policlonales como monoclonales corresponde a los residuos 55 a 80 de hPG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEC ID n°: 27). En la TABLA 1B, a continuación, y las secciones de Ejemplo se proporcionan inmunógenos ejemplificativos útiles para obtener anticuerpos anti-hPG C-terminales, así como secuencias CDR y VH y VL de anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales, obtenidos con estos inmunógenos ejemplificativos:

Tabla 1B Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales							
Inmunógeno	Híbrido (Nº de depósito)	MAb	Secuencias de CDR murina		Secuencias de V _H y V _L murinas	Secuencias de V _H y V _L humanizadas (proyectadas)	
C1	1B4A11D 11 (I-4371)	MAb5					
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6					
C1	1B11E4B1 1 (I-4373)	MAb7					
C1	1C10D3B 9	MAb8	V _H CDR 1.8	GFTFTTYA	(SEC ID nº: 37)	mV _H .8 (SEC ID nº: 59)	hV _H .8a (SEC ID nº: 75) hV _H .8b (SEC ID nº: 77) hV _H .8c (SEC ID nº: 79) hV _L .8a (SEC ID nº: 76) hV _L .8b (SEC ID nº: 78) hV _L .8c (SEC ID nº: 76)
			V _H CDR 2.8	ISSGGTYT	(SEC ID nº: 41)		
			V _H CDR 3.8	ATQGNYSLDF	(SEC ID nº: 45)		
			V _L CDR 1.8	KSLRHTKGITF	(SEC ID nº: 49)		
			V _L CDR 2.8	QMS	(SEC ID nº: 52)		
V _L CDR 3.8	AQNLELPLT	(SEC ID nº: 55)					
C1	1D8F5B3	MAb9					
C1	1E1C7B4	MAb10					
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11					
C1	2B11E6G 4 (I-4375)	MAb12					
C1	2C6C3C7	MAb13	V _H CDR 1.13	GFIFSSYG	(SEC ID nº: 38)	mV _H .13 (SEC ID nº: 60)	hV _H .13a (SEC ID nº: 80) hV _H .13b (SEC ID nº: 82)
			V _H CDR 2.13	INTFGDRT	(SEC ID nº: 42)		
			V _H CDR 3.13	ARGTGT	(SEC ID nº: 46)		
			V _L CDR 1.13	QSLDSDGKTY	(SEC ID nº: 50)		
			V _L CDR 2.13	LVS	(SEC ID nº: 53)		
			V _L CDR 3.13	WQGTTFPQT	(SEC ID nº: 56)		
C1	2H9F4B7	MAb14					
C2	1F11F5E10	MAb21					
C2	1F11F5G9	MAb22					
C2	1A11F2C9	MAb23					
Inmunógeno C1 = KLH-Cys-Ahx-Ahx-QGPMLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, también representado como KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 27)							
Inmunógeno C2 = DT-Cys-Ahx-Ahx-QGPMLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, también representado como DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 27)							

En la tabla 1B, todas las secuencias de aminoácidos se representan utilizando orientación N→C convencional. Para cada inmunógeno, el péptido progastrina se sintetizó con un enlazador Ahx-Ahx-Cys N-terminal, que se conjugó después o bien con un vehículo de hemocianina de lapa californiana ("KLH") o bien de una toxina de difteria ("DT") por medio de un residuo enlazador de Cys.

Los epítomos específicos unidos mediante los anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos MAb1-MAb23 proporcionados en las TABLAS 1A y 1B se cartografiaron utilizando la técnica SPOT y barrido de alanina, tal como se describe por Laune *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods 267:53-70 y Laune, 1997, J. Biol. Chem. 272:30937-30944, respectivamente (véase también, el Ejemplo 6 de la solicitud '329).

En la técnica SPOT se generan secuencias peptídicas de 15 aminoácidos que abarcan un epítipo putativo y se disponen en una membrana de nitrocelulosa que se sonda después con el anticuerpo de ensayo para determinar la secuencia de epítipo mínima reconocida por el anticuerpo. El barrido de alanina se utiliza para determinar residuos dentro de un epítipo que son críticos para la unión al anticuerpo. Cada residuo dentro de un epítipo putativo se muta, uno a uno, a una alanina, y los péptidos que contienen alanina se sondan después con el anticuerpo de ensayo.

Para anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales MAb 1-4 y 15-20, los epítomos comprenden por lo menos las secuencias siguientes: DAPLG (SEC ID n°: 28), PDAPLG (SEC ID n°: 29), PRSQQP (SEC ID n°: 30), WKPRSQQP (SEC ID n°: 31) o WKPRSQQPAPLG (SEC ID n°: 32), tal como se muestra en la TABLA 2A, a continuación.

N° de MAb	Antígeno de péptido PG: SWKPRSQQPAPLG	SEC ID n°
MAb2	WKPRSQQPAPLG	32
MAb4	WKPRSQQPAPLG	32
MAb1	PDAPLG	29
MAb3	DAPLG	28
MAb 17	WKPRSQQP	31
MAb18	WKPRSQQP	31
MAb19	WKPRSQQP	31
MAb20	WKPRSQQP	31
MAb15	PRSQQP	30
MAb16	PRSQQP	30

Para los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales MAb 5-7, 9-12, 14 y 21-23, los epítomos comprenden por lo menos las secuencias siguientes: FGRR (SEC ID n°: 33), MDFGR (SEC ID n°: 34), AEDEN (SEC ID n°: 35) y GWMDFGRR (SEC ID n°: 36), como se muestra en la TABLA 2B, a continuación.

N° de MAb	Antígeno de péptido PG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEC ID n°
MAb14	GWMDFGRR	36
MAb11	MDFGR	34
MAb5	FGRR	33
MAb6	FGRR	33
MAb7	FGRR	33
MAb9	FGRR	33
MAb10	FGRR..E	33
MAb12	FGRR	33
MAb23	AEDEN	35

Los experimentos de cartografiado del epítipo revelan que MAb2 y MAb4 anti-hPG se unen al mismo epítipo; MAb1 y MAb3 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítipo; MAb17, MAb18, MAb19 y MAb20 se unen aproximadamente al mismo epítipo; MAb15 y MAb16 se unen aproximadamente al mismo epítipo; MAb5, MAb6, MAb7, MAb9 y MAb12 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítipo y se unen aproximadamente al mismo epítipo que MAb10 anti-hPG; y MAb11 y MAb14 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítipo.

Realizaciones específicas de anticuerpos anti-PG N-terminales útiles en los procedimientos y kits descritos en la presente memoria incluyen anticuerpos que se unen a un epítipo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID n°: 28), los residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID n°: 29), los residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID n°: 30), los residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID n°: 31) o los residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID n°: 32).

Realizaciones específicas de anticuerpos anti-PG C-terminales útiles en los procedimientos y kits descritos en la

presente memoria incluyen anticuerpos que se unen a un epítipo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID n°: 33), los residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID n°: 34), los residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID n°: 35) o los residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID n°: 36).

5 Los anticuerpos N-terminales y C-terminales anti-hPG útiles en los procedimientos y kits divulgados en la presente memoria, además de los proporcionados en las TABLAS 1A y 1B, pueden identificarse en ensayos de unión competitivos con los MAb de ejemplo 1-23, o con otros anticuerpos de referencia que se unen a epítipos N-terminales o C-terminales, tal como se describirá con más detalle en una sección posterior.

10 Como también se informa en las solicitudes '329 y '041, no todos los anticuerpos anti-hPG, incluso aquellos que muestran un alto grado de especificidad y de afinidad por la hPG, neutralizan la actividad biológica de la hPG. Por ejemplo, aunque el Mab14 anti-hPG se une a hPG con una KD aproximadamente 6 pM, no inhibe, por lo menos en la concentración analizada, el crecimiento de determinadas células del cáncer colorrectal en un ensayo *in vitro*, mientras que otros anticuerpos monoclonales anti-hPG, por ejemplo MAb1-MAb13 y MAb15-MAb23, muestran una actividad inhibitoria en diversos grados. Aunque tanto los anticuerpos no neutralizantes como los neutralizantes que se unen específicamente a hPG son útiles para los procedimientos de diagnóstico de la presente divulgación, los anticuerpos anti-hPG útiles para procedimientos terapéuticos deberán mostrar actividad neutralizante. Tal como se describe en los Ejemplos, se ha demostrado que MAb3 y MAb8 tenían actividad neutralizante cuando se analizaron para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de células del cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7 en cultivo. Puede determinarse empíricamente si otros anticuerpos de la presente divulgación son neutralizantes.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo anti-hPG neutralizante" es un anticuerpo anti-hPG que proporciona una reducción estadísticamente significativa del número de células del cáncer de mama vivas en una muestra de ensayo tratada con el anticuerpo anti-hPG en comparación con una muestra de control tratada con un anticuerpo no específico. Un ensayo específico para evaluar la capacidad de cualquier anticuerpo anti-hPG particular de ser neutralizante se describe en el Ejemplo 13. Aquellos anticuerpos anti-hPG que muestran por lo menos una reducción de aproximadamente el 50% en el número de células del cáncer de mama vivas en este ensayo se piensa que son especialmente útiles en el tratamiento del cáncer de mama, aunque se espera que los anticuerpos anti-hPG que muestran niveles inferiores de actividad neutralizante, por ejemplo una reducción estadísticamente significativa del 40%, 30%, 20%, 15% o incluso el 10%, en el número de células del cáncer de mama vivas en este ensayo proporcionen beneficios terapéuticos. Las células ejemplificativas para su utilización en estos ensayos incluyen, pero sin limitación, las estirpes celulares del cáncer de mama sensible a PG descritas en la presente memoria.

35 En consecuencia, en algunas formas de realización, por ejemplo formas de realización terapéuticas, los anticuerpos anti-hPG útiles son neutralizantes. Tal como se divulga en la presente memoria y en las solicitudes '329 y '041, la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG para ser neutralizante no depende del epítipo, dado que anticuerpos monoclonales anti-hPG tanto N-terminales (por ejemplo, MAb3) como C-terminales (por ejemplo, MAb8) mostraron actividad neutralizante en ensayos con células del cáncer de mama. Por lo tanto, en algunas formas de realización específicas, los anticuerpos anti-hPG neutralizantes son anticuerpos anti-hPG neutralizantes N-terminales. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-hPG neutralizantes son anticuerpos anti-hPG neutralizantes C-terminales.

45 La afinidad de cualquier anticuerpo anti-hPG específico no es crítica. No obstante, para algunas aplicaciones, pueden preferirse anticuerpos que muestran afinidades de por lo menos aproximadamente 1 μ M. Para aplicaciones terapéuticas, una afinidad de por lo menos aproximadamente 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, 0,001 nM o incluso superior, puede ser deseable. Las afinidades medidas de los anticuerpos monoclonales anti-hPG identificados en las TABLAS 1A y 1B varían de 10^{-6} a 10^{-12} M, tal como se indica en la TABLA 3, a continuación:

Tabla 3	
Anticuerpo monoclonal	Constante de afinidad medida Kd (M)
MAb1 anti-hPG	2,5 μ M ($2,5 \times 10^{-6}$ M)
MAb2 anti-hPG	185 nM ($1,85 \times 10^{-7}$ M)
MAb3 anti-hPG	6,4 nM ($6,4 \times 10^{-9}$ M)
MAb4 anti-hPG	3,5 nM ($3,5 \times 10^{-9}$ M)
MAb5 anti-hPG	13 pM ($1,30 \times 10^{-11}$ M)
MAb6 anti-hPG	0,6 nM ($6,38 \times 10^{-10}$ M)
MAb7 anti-hPG	58 pM ($5,84 \times 10^{-11}$ M)
MAb8 anti-hPG	0,1 nM ($1,08 \times 10^{-10}$ M)
MAb10 anti-hPG	3,6 nM ($3,62 \times 10^{-9}$ M)
MAb11 anti-hPG	0,3 nM ($3,12 \times 10^{-10}$ M)

Tabla 3	
Anticuerpo monoclonal	Constante de afinidad medida Kd (M)
MAb12 anti-hPG	0,4 nM ($4,43 \times 10^{-10}$ M)
MAb13 anti-hPG	0,6 nM ($6,12 \times 10^{-10}$ M)
MAb14 anti-hPG	6,8 pM ($6,86 \times 10^{-12}$ M)
MAb15 anti-hPG	0,2 nM ($2,11 \times 10^{-10}$ M)
MAb16 anti-hPG	0,2 nM ($2,78 \times 10^{-10}$ M)
MAb17 anti-hPG	8,3 nM ($8,29 \times 10^{-9}$ M)
MAb18 anti-hPG	1,2 nM ($1,24 \times 10^{-9}$ M)
MAb19 anti-hPG	0,7 nM ($7,79 \times 10^{-10}$ M)
MAb20 anti-hPG	0,2 nM ($2,47 \times 10^{-10}$ M)
MAb21 anti-hPG	3,9 nM ($3,90 \times 10^{-9}$ M)
MAb22 anti-hPG	5 nM ($4,94 \times 10^{-9}$ M)
MAb23 anti-hPG	0,4 μ M ($3,99 \times 10^{-7}$ M)

Un anticuerpo monoclonal anti-hPG que tiene una afinidad especialmente adaptada a una aplicación deseada particular puede seleccionarse fácilmente de entre estos, o generarse o diseñarse utilizando los diversos inmunógenos, secuencias de región determinante de la complementariedad (CDR), secuencias de la cadena pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de anticuerpos anti-hPG descritos en la presente memoria. La afinidad de cualquier anticuerpo monoclonal anti-PG particular puede determinarse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica o descritas en la presente documento, tales como, por ejemplo, ELISA, calorimetría de valoración isotérmica (ITC), BIAcore o ensayos de polarización fluorescente. Se proporciona un ensayo específico en el ejemplo 14.

Como se indica en las TABLAS 1A y 1B, se ha identificado una serie de anticuerpos monoclonales N-terminales y C-terminales específicos para hPG y, tal como se divulga en las solicitudes '329 y '041, todos excepto MAb14 mostraron actividad neutralizante contra determinadas células del cáncer colorrectal. Adicionalmente, tal como se describe en los Ejemplos, MAb3, MAb8, MAb13, MAb16 y MAb19 mostraron actividad neutralizante contra células del cáncer de mama MDA-MB-231 y MAb 3 mostró actividad neutralizante contra células del cáncer de mama MCF7.

Varios de los hibridomas útiles para obtener los anticuerpos se depositaron el 6 de octubre de 2010 en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* (CNCM) de acuerdo con el Tratado de Budapest. Los nombres designados de los hibridomas productores de MAb1-23 anti-hPG y los números de registro de depósito de estos hibridomas depositados se proporcionan en las TABLAS 1A y 1B. Además, para varios de los anticuerpos, se han determinado las secuencias de aminoácidos de sus cadenas pesadas variables (VH), cadenas ligeras variables (VL), regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VL y CDR de VH. Estas secuencias de aminoácidos y la nomenclatura abreviada utilizada para referenciarlas a lo largo de la divulgación, se proporcionan también en las TABLAS 1A y 1B. En síntesis, los dominios variables de cadena pesada y ligera murinos se denominan en la presente memoria mVH y mVL seguidos por el número del anticuerpo monoclonal correspondiente, por ejemplo mVH.3 y mVL.3 para las cadenas pesada variable y ligera variable de MAb3 anti-hPG, respectivamente. De forma similar, los dominios variables de cadena pesada y ligera humanos se denominan en la presente memoria hVH y hVL seguido por el número del anticuerpo monoclonal correspondiente. Las tres CDR de la cadena pesada variable y las tres CDR de la cadena ligera variable se denominan VH CDR 1, 2 o 3, y VL CDR 1, 2 o 3, respectivamente, seguido por el número del anticuerpo monoclonal anti-hPG específico. Por ejemplo, VH CDR 1 de MAb3 se denomina VH CDR 1.3 y VL CDR 1 de MAb3 se denomina VL CDR 1.3. VH CDR 2 de MAb3 se denomina VH CDR 2.3 y VL CDR 2 de MAb3 se denomina VL CDR 2.3.

Se espera que las CDR y/o cadenas VH y VL correspondientes de anticuerpos monoclonales anti-hPG que se unen aproximadamente a los mismos epítopos puedan intercambiarse para proporcionar nuevos anticuerpos monoclonales anti-hPG útiles en los procedimientos y los kits descritos en la presente memoria. Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos MAb5 y MAb6 se unen al mismo epítipo. Un anticuerpo monoclonal anti-hPG puede diseñarse de modo que incluya, en su cadena VL, diversas combinaciones de las VL CDR de estos dos anticuerpos, y/o en su cadena VH diversas combinaciones de las VH CDR de estos dos anticuerpos. Como ejemplo específico no limitativo para ilustrar las diversas combinaciones posibles, dicho anticuerpo podría incluir en su cadena VL, CDR 1 y 2 de MAb5 (VL CDR 1.5 y VL CDR 2.5, respectivamente) y CDR 3 de MAb6 (VL CDR 3.6), y en su cadena VH, CDR 1 de MAb6 (VH CDR 1.6) y CDR 2 y 3 de MAb5 (VH CDR 2.5 y VH CDR 3.5, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de CDR de anticuerpos producidos por hibridomas que se han depositado pueden obtenerse utilizando medios convencionales.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de anticuerpos producidos por hibridomas que se han depositado

- pueden obtenerse utilizando medios convencionales. Por ejemplo, las secuencias relevantes de los anticuerpos producidos por hibridomas 6B5B11C10 y 20D2C3G2 se determinaron de la forma siguiente. En síntesis, se aisló ARN total de sedimentos celulares congelados utilizando reactivo RNABee, N° de catálogo de AMSBio CS-104B, utilizado según las instrucciones del fabricante. Se preparó ADNc para regiones V a partir de ARNm utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), seguida por la amplificación rápida 5' de extremos del ADNc (RACE). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de la región constante, después de lo cual se purificó el producto de primera cadena y se utilizó desoxinucleótido transferasa terminal para añadir colas homopoliméricas a los extremos 3' del ADNc. Las secuencias de ADNc "con colas" se amplificaron después mediante PCR utilizando pares de cebadores, un cebador para cada cola homopolimérica y cualquiera de entre la región VH o la región VL, respectivamente. Los productos PCR de región variable de cadena pesada y la ligera se clonaron después en un vector de clonación "TA" (p-GEM-T easy, N° de cat. De Promega A 1360) y se secuenciaron utilizando procedimientos estándar. Véanse las figuras 14A-B (MAb 3) y las figuras 14C-D (MAb 4).
- De forma similar, se determinaron secuencias relevantes de anticuerpos producidos por hibridomas 1C10D3B9, 2C6C3C7, 1 B3B4F1 y 1 E9D9B61 de la forma siguiente. Se aisló ARN total de sedimentos celulares congelados utilizando el kit RNAqueous®-4PCR (N° de cat. de Ambion AM1914) que se utilizó según las instrucciones del fabricante. Se amplificó ARNm de la región V de la cadena pesada utilizando un conjunto de seis agrupaciones de cebadores degenerados (HA a HF) y se amplificó ARNm de la región V de la cadena ligera utilizando un conjunto de ocho agrupaciones de cebadores degenerados, siete para el agrupamiento (*cluster*) κ (KA a KG) y uno para el agrupamiento (*cluster*) λ (LA). Se preparó ADNc para regiones variables a partir de ARNm utilizando RT-PCR. La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de región constante, seguida por PCR utilizando agrupaciones de cebadores degenerados para secuencias de señal murinas 5' y cebadores para regiones constantes 3' para cada uno de IgGVH, IgkVL e IglVL. (Jones *et al.*, 1991, Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions, Bio/Technology 9:88-89). Los productos PCR de la región variable de cadena pesada y la ligera se clonaron después en un vector de clonación "TA" (p-GEM-T easy, N° de cat. de Promega A 1360) y se secuenciaron utilizando procedimientos estándar. Véanse las figuras 14E-F (MAb 8), 14G-H (MAb 13), 14I-J (MAb 16) y 14K-L (MAb 19).
- Haciendo referencia a la TABLA 1A, formas de realización específicas de anticuerpos anti-hPG N-terminales útiles en los procedimientos y kits descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, los siguientes:
- (a) anticuerpos que tienen V_L CDR que corresponden en secuencia a las V_L CDR de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20, y V_H CDR que corresponden en secuencia a las V_H CDR de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb19, MAb19 o MAb20;
 - (b) anticuerpos que tienen V_L CDR y V_H CDR que corresponden en secuencia a las V_L CDR y V_H CDR de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20;
 - (c) anticuerpos en los que:
 - i. V_L CDR 1 se selecciona de entre QSIV_HSNGNTY (" V_L CDR 1.3"; SEC ID n°: 4), QSLV_HSSGVTY (" V_L CDR 1.4"; SEC ID n°: 10), QSLLDSDGKTY (" V_L CDR 1.16"; SEC ID n°: 50) y SQHRTYT (" V_L CDR 1.19"; SEC ID n°: 51);
 - ii. V_L CDR2 se selecciona de entre KVS (" V_L CDR 2.3" y (" V_L CDR 2.4"; SEC ID n°: 5), LVS (" V_L CDR 2.16"; SEC ID n°: 53) y VKKDGSH (" V_L CDR 2.19"; SEC ID n°: 54);
 - iii. V_L CDR3 se selecciona de entre FQGSHVPFT (" V_L CDR 3.3"; SEC ID n°: 6), SQSTHVPPT (" V_L CDR 3.4"; SEC ID n°: 11), WQGTHSPYT (" V_L CDR 3.16"; SEC ID n°: 57) y GVGDAIKGQSVFV (" V_L CDR 3.19"; SEC ID n°: 58);
 - iv. V_H CDR1 se selecciona de entre GYIFTSYW (" V_H CDR 1.3"; SEC ID n°: 1), GYTFSSSW (" V_H CDR 1.4"; SEC ID n°: 7), GYTFTSY ("V_H CDR 1.16"; SEC ID n°: 39) y GYSITSDYA (" V_H CDR 1.19"; SEC ID n°: 40);
 - v. V_H CDR2 se selecciona de entre FYPGNSDS (" V_H CDR 2.3"; SEC ID n°: 2), FLPGSGST (" V_H CDR 2.4"; SEC ID n°: 8), INPSNGGT (" V_H CDR 2.16"; SEC ID n°: 43) y ISFSGYT (" V_H CDR 2.19"; SEC ID n°: 44); y
 - vi. V_H CDR3 se selecciona de entre TRRDSPQY (" V_H CDR 3.3"; SEC ID n°: 3), ATDGNYDWFAY (" V_H CDR 3.4" SEC ID n°: 9), TRGGYYPFDY (" V_H CDR 3.16"; SEC ID n°: 47) y AREVNYGDSYHFDY (" V_H CDR 3.19"; SEC ID n°: 48);
 - (d) anticuerpos que tienen una VL que corresponde en secuencia a la VL de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20 y una VH que corresponde en secuencia a la VH de

MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20; y

- (e) anticuerpos que tienen una VL y una VH que corresponde en secuencia a la VL y la VH de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20.

Haciendo referencia a la TABLA 1B, formas de realización específicas de anticuerpos anti-hPG C-terminales útiles en los procedimientos y kits descritos en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, las siguientes:

- (f) anticuerpos que tienen VL CDR que corresponden en secuencia a las VL CDR de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23 y VH CDR que corresponden en secuencia a las VH CDR de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23;

- (g) anticuerpos que tienen VL CDR y VH CDR que corresponden en secuencia a las VL CDR y VH CDR de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23;

(h) anticuerpos en los que:

- vii. VL CDR1 se selecciona de entre KSLRHTKGITF ("VL CDR 1.8"; SEC ID n°: 49) y QSLLDSDGKTY ("VL CDR 1.13"; SEC ID n°: 50);

- viii. VL CDR2 se selecciona de entre QMS ("VL CDR 2.8"; SEC ID n°: 52) y LVS ("VL CDR 2.13"; SEC ID n°: 53);

- ix. VL CDR3 se selecciona de entre AQNLELPLT ("VL CDR 3.8"; SEC ID n°: 55) y WQGTHFPQT ("VL CDR 3.13"; SEC ID n°: 56);

- x. VH CDR1 se selecciona de entre GFTFTTYA ("VH CDR 1.8"; SEC ID n°: 37) y GFIFSSYG ("VH CDR 1.13"; SEC ID n°: 38);

- xi. VH CDR2 se selecciona de entre ISSGGTYT ("VH CDR 2.8"; SEC ID n°: 41) y INTFGDRT ("VH CDR 2.13"; SEC ID n°: 42); y

- xii. VH CDR3 se selecciona de entre ATQGNYSLDF ("VH CDR 3.8"; SEC ID n°: 45) y ARGTGTY ("VH CDR 3.13"; SEC ID n°: 46);

- (i) anticuerpos que tienen una VL que corresponde en secuencia a la VL de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23 y una VH que corresponde en secuencia a la VH de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23; y

- (j) anticuerpos que tienen una VL y una VH que corresponden en secuencia a la VL y la VH que corresponden en secuencia a la VL y la VH de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23.

Como apreciarán los expertos, los anticuerpos anti-hPG útiles en los procedimientos de diagnóstico pueden tener cualquier origen, incluido, por ejemplo, mamífero (por ejemplo, humano, primate, roedor, cabra o conejo), no mamífero o de naturaleza quimérica (derivado de más de una especie de origen). Los anticuerpos adecuados para aplicaciones terapéuticas en animales, incluidos seres humanos, se derivan preferentemente de la misma especie que se desea tratar, o se han modificado o diseñado para que sean no inmunogénicos o tengan una inmunogenicidad reducida en el animal que se va a tratar. Una clase específica de anticuerpos anti-hPG útiles para aplicaciones terapéuticas en seres humanos es la clase de anticuerpos humanizados, que se aborda con más detalle más adelante. Los anticuerpos anti-hPG útiles en los procedimientos y kits descritos en la presente memoria también pueden ser, o derivarse de, cualquier isotipo, por ejemplo IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) o IgM. Los anticuerpos anti-hPG diseñados para aplicaciones terapéuticas son preferentemente del isotipo IgG.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-hPG útiles para procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria están humanizados. En general, los anticuerpos humanizados comprenden sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de marco estructural son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana y pueden denominarse "CDR-injertada". El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para humanizar anticuerpos, incluidos procedimientos para diseñar anticuerpos humanizados, son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Lefranc *et al.*, 2003,

Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77; Lefranc *et al.*, 2009, Nucl. Acids Res. 37:D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-7; patentes de Estados Unidos N° 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*; documento EP239400; publicación PCT WO 91/09967; patente de Estados Unidos N° 5.225.539; documento EP592106; documento EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol. 28:489-498; Studnicka *et al.*, 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; y patente de Estados Unidos N° 5.565.332.

Las versiones humanizadas de anticuerpos que tienen secuencias de CDR correspondientes a las CDR de anticuerpos anti-hPG no humanos, incluidos a modo de ejemplo y no de limitación los diversos anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales proporcionados en la TABLA 1A y los diversos anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales proporcionados en la TABLA 1B, pueden obtenerse utilizando estos procedimientos bien conocidos. Las secuencias proyectadas para cadenas VL y VH humanizadas de anticuerpos anti-hPG seleccionados se proporcionan en las TABLAS 1A y 1B. Los ejemplos específicos de anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que comprenden:

- a) cualquiera de las tres V_L CDR y cualquiera de las tres V_H CDR divulgadas en la presente memoria;
- b) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID n°: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID n°: 22;
- c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID n°: 23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID n°: 24;
- d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 75, 77 y 79 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 76 y 78;
- e) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 80 y 82 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 81 y 83;
- f) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 84, 86 y 88 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 85, 87 y 89; y
- g) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 90, 92 y 94 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID n°: 91, 93 y 95.

Como apreciarán los expertos, los anticuerpos anti-hPG que tienen propiedades de unión específicas, tales como la capacidad a unirse a un epítipo específico de interés, pueden obtenerse fácilmente utilizando los diversos antígenos e inmunógenos descritos en la presente memoria y evaluando su capacidad para competir por la unión a hPG con un anticuerpo de referencia de interés. Puede utilizarse cualquiera de los anticuerpos anti-hPG descritos en la presente memoria como anticuerpos de referencia en dicho ensayo de competencia. Un ensayo específico útil para evaluar la capacidad de un anticuerpo para competir por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado de interés se proporciona en el Ejemplo 15.

En la forma de realización de un estudio de competencia de anticuerpos entre un anticuerpo anti-hPG de referencia y cualquier anticuerpo de ensayo (independientemente de especies o isotipos), se puede marcar en primer lugar la referencia con una marca detectable directamente, tal como, por ejemplo, un radioisótopo o fluoróforo, o indirectamente, tal como, por ejemplo, biotina (detectable por medio de la unión con estreptavidina marcada fluorescentemente) o una enzima (detectable por medio de una reacción enzimática), para permitir la identificación subsiguiente. En este caso, un anticuerpo anti-hPG de referencia marcado (en concentraciones fijas o crecientes) se incuba con una cantidad conocida de hPG, formando un complejo hPG:anticuerpo anti-hPG marcado. El anticuerpo de ensayo no marcado se añade después al complejo. La intensidad de la marca complejada se mide. Si el anticuerpo de ensayo compite con el anticuerpo anti-hPG de referencia marcado por la hPG mediante la unión a un epítipo solapante, la intensidad de la marca complejada se reducirá con respecto al experimento de control llevado a cabo en ausencia del anticuerpo de ensayo.

Se conocen numerosos procedimientos para llevar a cabo ensayos de competencia de unión y pueden adaptarse para proporcionar resultados comparables al ensayo descrito anteriormente y en el ejemplo 15.

Se considera que un anticuerpo compite por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia y, por lo tanto, se considera que se une aproximadamente al mismo epítipo de hPG, o a uno solapante, que el anticuerpo

anti-hPG de referencia, si reduce la unión del anticuerpo anti-hPG de referencia a hPG en un ensayo de unión de competencia, y específicamente el ensayo de unión de competencia del ejemplo 15, en por lo menos el 50%, a una concentración de anticuerpo de ensayo en el intervalo de 0,01-100 µg/ml (por ejemplo, 0,01 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,4 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml o 100 µg/ml u otra concentración dentro del intervalo indicado), aunque pueden ser deseables niveles superiores de reducción, por ejemplo del 60%, 70%, 80%, 90% o incluso el 100%.

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden derivarse, modificarse covalentemente o conjugarse con otras moléculas para modificar sus propiedades o mejorar su función. Por ejemplo, pero no limitativo, los anticuerpos derivatizados incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glicosilación, fucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, formilación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Como alternativa, pueden modificarse aminoácidos específicos de las regiones variables o constantes para cambiar o mejorar su función. En un ejemplo no limitativo, pueden modificarse residuos de aminoácidos de la región Fc de un anticuerpo para aumentar la semivida en suero del anticuerpo aumentando su unión a FcRn.

Los anticuerpos monoclonales anti-hPG incluyen anticuerpos marcados con un resto detectable. Dicha marca puede conjugarse directamente o indirectamente con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la divulgación. La marca puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas de radioisótopos, marcas isotópicas o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la modificación química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Aunque los diversos anticuerpos anti-hPG útiles en los procedimientos y kits descritos en la presente memoria se han ejemplificado con anticuerpos de longitud completa, los expertos apreciarán que también pueden utilizarse fragmentos de unión, o anticuerpos sustitutivos diseñados o derivados de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión. Los fragmentos adecuados, sustitutivos, etc., incluyen, pero sin limitación, fragmentos y *surrobodyes* Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, vIgG, scFv, rIgG, anticuerpos Fv estabilizados con disulfuro (dsFv), diacuerpos, triacuerpos y anticuerpos de dominio simple, tales como un anticuerpo o nanocuerpo camelizado.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden producirse según cualquier forma conocida por los expertos en la materia. En un ejemplo no limitativo, pueden obtenerse anticuerpos a partir de fuentes naturales, incluyendo cualquier especie capaz de producir anticuerpos, tales como anticuerpos derivados de seres humanos, simios, pollo, cabras, conejos y roedores (por ejemplo, ratas, ratones y hámsteres). También son posibles otras especies. También pueden generarse y aislarse anticuerpos a partir de sistemas que utilizan ingeniería genética o tecnología de ADN recombinante, tales como, pero sin limitación, expresión de anticuerpos recombinantes en células de levadura, células bacterianas y células de mamífero en cultivos, tales como células CHO. Los anticuerpos también pueden ser totalmente o parcialmente sintéticos.

Los anticuerpos monoclonales (MAb) de la presente divulgación no están limitados a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal se deriva de un único clon, incluido cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago, por cualquier medio disponible o conocido en la técnica. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando una amplia diversidad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen la utilización de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas.

8. Tratamientos para el cáncer de mama

Los tratamientos para el cáncer de mama se clasifican en diversas categorías.

Se considera la cirugía cuando el cáncer de mama está limitado a la mama, o a la mama y los ganglios linfáticos axilares. Las técnicas quirúrgicas eficaces para tratar el cáncer de mama incluyen, pero no están limitadas necesariamente a, lumpectomía, cuadrantectomía, mastectomía simple, mastectomía radical y mastectomía radical modificada.

Puede utilizarse radioterapia para destruir células de cáncer de mama remanentes después de la cirugía. La radiación puede producirse mediante una máquina exterior al cuerpo (radioterapia de haz externo) o puede producirse mediante un material radiactivo dispuesto en el cuerpo cerca de células de cáncer (radioterapia interna o braquiterapia).

La quimioterapia, el tratamiento hormonal y el tratamiento dirigido son ejemplos no limitativos de tratamientos sistémicos que pueden utilizarse como tratamientos complementarios después de cirugía, o cirugía y radiación, o como tratamientos principales contra el cáncer de mama metastásico que se ha extendido más allá de la mama a órganos distantes. Dichos tratamientos pueden utilizarse solos o en combinación entre sí. Un tratamiento

complementario es uno administrado con el fin de destruir células cancerosas que pueden haber sobrevivido a la cirugía o a la radioterapia.

5 También pueden utilizarse radioterapia y/o cirugía para tratar cáncer de mama metastásico, por ejemplo para tratar un número pequeño de metástasis en una zona determinada, para prevenir fracturas de hueso o bloqueo en el hígado, o para proporcionar alivio del dolor o de otros síntomas. La metástasis de cáncer de mama que se ha extendido a huesos puede tratarse con radioterapia de haz externo y/o bisfosfonatos tales como pamidronato (Aredia) o ácido zoledrónico (Zometa), junto con calcio y vitamina D, para fortalecer los huesos.

10 La quimioterapia se basa en fármacos que destruyen o ralentizan o detienen el crecimiento de células del cáncer de mama. Están disponibles una diversidad de agentes quimioterápicos que actúan por medio de diferentes mecanismos para tratar el cáncer de mama. La quimioterapia puede ser eficaz contra el cáncer de mama metastásico cuando se administra sistémicamente, pero también puede administrarse de una forma más localizada, tal como en el líquido que rodea el cerebro.

15 Los ejemplos de agentes quimioterápicos que pueden ser eficaces contra el cáncer de mama incluyen antagonistas de folato, incluidos metotrexato y pemetrexed; antagonistas de purina, incluidas cladribina, clofarabina, fludarabina, 6-mercaptopurina, nelarabina, pentostatina; antagonistas de pirimidinas, incluidos capecitabina, citarabina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, hidroxurea; modificadores de la respuesta biológica, incluido el interferón-alfa; bleomicina; agentes alquilantes de ADN, incluidas nitrosoureas, carmustina, lomustina; fármacos reticulantes y agentes alquilantes del ADN, incluidos bendamustina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), melfalán, dacarbazina, temozolomida, procarbazona; asparaginasa; antibióticos, incluida la mitomicina; complejos de platino, incluidos carboplatino, cisplatino, oxaliplatino; inhibidores de proteosoma, incluido el bortezomib; venenos fusiformes, tales como los taxanos (incluidos docetaxel, paclitaxel) y las vincas (incluidas vinblastina, vincristina, vinorelbina); inhibidores de topoisomerasa, tales como las antraciclinas (incluidas daunorrubicina, daunomicina, doxorrubicina, epirubicina), las camptotecinas, (incluidos irinotecán, topotecán), las podofilotoxinas (incluidos etopósido, tenipósido y mitoxantrona); inhibidores de tirosina cinasa, (incluidos erlotinib (Tarceva), gefitinib, imatinib, lapatinib, sorafenib, sunitinib). También se conocen otros agentes quimioterápicos.

20 Los agentes quimioterápicos, y las combinaciones de los mismos, que se sabe que son eficaces contra el cáncer de mama incluyen, pero sin limitación, CMF, que es una combinación de ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo; CAF (FAC), que es una combinación de ciclofosfamida, doxorrubicina y 5-fluorouracilo; AC, que es una combinación de doxorrubicina y ciclofosfamida; EC, que es una combinación de epirubicina y ciclofosfamida; TAC, que es una combinación de docetaxo, doxorrubicina y ciclofosfamida; AC → T, que es una combinación de doxorrubicina y ciclofosfamida seguida de paclitaxel o docetaxel (puede administrarse herceptina con el paclitaxel o el docetaxel para tumores positivos HER2/neu); A → CMF, que es una combinación de doxorrubicina, seguida de CMF; CEF (FEC), que es una combinación de ciclofosfamida, epirubicina y 5-fluorouracilo (esta puede estar seguida de docetaxel); TC, que es una combinación de docetaxel y ciclofosfamida; TCH, que es una combinación de docetaxel, carboplatino y herceptina para tumores positivos HER2/neu.

25 Otros agentes quimioterápicos que pueden ser eficaces contra el cáncer de mama incluyen cisplatino, vinorelbina, capecitabina, doxorrubicina liposomal pegilada, gemcitabina, mitoxantrona, ixabepilona y paclitaxel unido a albúmina, etc.

30 El estrógeno promueve el crecimiento de aproximadamente dos tercios de los cánceres de mama, es decir, aquellos que contienen receptores de estrógeno (cánceres positivos a ER) y/o receptores de progesterona (cánceres positivos a PR). Por lo tanto, en pacientes con cánceres de mama positivos a ER y positivos a PR, el tratamiento hormonal busca bloquear el efecto del estrógeno o reducir los niveles de estrógeno. Por lo tanto, el tratamiento hormonal abarca la administración de hormonas sintéticas o de otros fármacos eficaces en bloquear la producción y/o la actividad de las hormonas naturales del cuerpo que, de otra forma, podrían apoyar o promover el crecimiento de células del cáncer de mama sensible a hormonas.

35 El tamoxifeno, el toremifeno y el raloxifeno son ejemplos de moduladores del receptor de estrógeno selectivos (SERM) y anti-estrógenos que antagonizan receptores de estrógeno en células del cáncer de mama. El fulvestrant, que actúa eliminando receptores de estrógeno, puede ser eficaz incluso cuando el cáncer de mama no responde ya al tamoxifeno. Los inhibidores de aromatasa actúan deteniendo la producción de estrógeno, e incluyen los fármacos letrozol, anastrozol y exemestano. También puede utilizarse la ablación de ovarios para eliminar la fuente principal de estrógenos en mujeres premenopáusicas. La ablación de ovarios permanente puede realizarse extirpando quirúrgicamente los ovarios. La ablación de ovarios también puede efectuarse con fármacos conocidos como análogos de hormonas liberadoras de hormonas luteinizantes, tales como goserelina o leuprolide, que pueden utilizarse solos o con tamoxifeno como tratamiento hormonal en mujeres premenopáusicas. Puede utilizarse acetato de megestrol en mujeres cuyos cánceres no responden a los otros tratamientos hormonales. También puede considerarse el uso de andrógenos. También son posibles otros agentes de tratamiento hormonal, tales como bicalutamida y flutamida.

El tratamiento dirigido se dirige a genes o productos génicos particulares que se sabe que están implicados en el cáncer de mama. Un tipo específico de tratamiento dirigido es el tratamiento con anticuerpos que implica administrar un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal, que destruye directamente o indirectamente, ralentiza o detiene el crecimiento de células del cáncer de mama. Dichos anticuerpos pueden actuar por medio de una diversidad de distintos mecanismos. Por ejemplo, determinados anticuerpos pueden marcar células de cáncer para el ataque por el sistema inmunitario del paciente mediante citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) u otros mecanismos. Otros anticuerpos se unen y alteran o inhiben la función de antígenos que las células del cáncer necesitan para su supervivencia o su crecimiento. También son posibles otros mecanismos. También pueden conjugarse anticuerpos a restos radiactivos o quimioterápicos capaces de destruir células del cáncer después de unirse al antígeno correspondiente expresado en las células del cáncer.

Algunos ejemplos de tratamiento con anticuerpos dirigidos contra el cáncer de mama son los anticuerpos monoclonales trastuzumab y bevacizumab. El trastuzumab y anticuerpos similares se dirigen al producto génico HER2, mientras que el bevacizumab y anticuerpos similares se dirigen al VEGF. El trastuzumab puede administrarse a mujeres con cánceres positivos a HER2 solo o en combinación con quimioterapia, así como con otros tratamientos. El bevacizumab puede combinarse con el fármaco de quimioterapia paclitaxel, así como con otros.

Otros tipos de tratamientos dirigidos incluyen fármacos de molécula pequeña, tales como lapatinib. Los cánceres positivos a HER2 que no responden ya a trastuzumab pueden responder a lapatinib, que puede administrarse con el fármaco quimioterápico capecitabina, así como con otros.

9. Procedimientos terapéuticos que utilizan anticuerpos anti-PG

La presente divulgación proporciona procedimientos terapéuticos que comprenden la administración de un anticuerpo anti-PG en una composición a un sujeto con el fin de tratar y prevenir el cáncer de mama metastásico, prevenir la recurrencia del cáncer de mama metastásico y prevenir el crecimiento de células madre del cáncer de mama. En determinadas formas de realización los anticuerpos son específicos para la progastrina humana ("hPG") y en otras formas de realización dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

Según algunas de estas formas de realización, los anticuerpos anti-PG divulgados en la presente memoria se administran en una composición a un sujeto con necesidad de tratamiento del cáncer de mama metastásico en una cantidad terapéuticamente eficaz como monoterapia o como politerapia. Dichos sujetos incluyen, pero sin limitación, aquellos a los que se ha diagnosticado cáncer de mama metastásico. En determinadas formas de realización de estos procedimientos, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales anti-PG.

Según otras formas de realización, los anticuerpos anti-PG divulgados en la presente memoria se administran en una composición a un sujeto con necesidad de prevención del cáncer de mama metastásico en una cantidad terapéuticamente eficaz como monoterapia o como politerapia. Dichos sujetos incluyen, pero sin limitación, aquellos a los que se ha determinado que padecen cáncer de mama primario pero en los que se desconoce si el cáncer se ha extendido a tejidos u órganos distantes. En determinadas formas de realización de estos procedimientos, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales anti-PG.

Según otras formas de realización más, los anticuerpos anti-PG divulgados en la presente memoria se administran en una composición a un sujeto con necesidad de prevención de la recurrencia del cáncer de mama metastásico en una cantidad terapéuticamente eficaz como monoterapia o como politerapia. Dichos sujetos incluyen, pero sin limitación, aquellos que se han tratado previamente de cáncer de mama primario o metastásico, después de cuyo tratamiento dicho cáncer aparentemente desapareció. En determinadas formas de realización de estos procedimientos, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales anti-PG.

Según otras formas de realización, los anticuerpos anti-PG divulgados en la presente memoria se administran en una composición a un sujeto con necesidad de inhibición del crecimiento de células madre del cáncer de mama en una cantidad terapéuticamente eficaz como monoterapia o como politerapia. Dichos sujetos incluyen, pero sin limitación, aquellos que padecen un cáncer de mama cuyo crecimiento o metástasis se puede atribuir por lo menos parcialmente a la presencia dentro del mismo de células madre del cáncer. Otras formas de realización proporcionan procedimientos de prevención o inhibición del crecimiento de células madre del cáncer de mama poniendo en contacto dichas células madre con una cantidad de una composición de anticuerpos anti-PG eficaz para prevenir o inhibir el crecimiento de dichas células. Dichos procedimientos pueden llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro*. En determinadas formas de realización de estos procedimientos, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales anti-PG.

Los anticuerpos anti-PG neutralizantes serán los agentes activos principales en composiciones de anticuerpos terapéuticas, aunque puede haber presencia de anticuerpos anti-PG no neutralizantes si su presencia no inhibe sustancialmente la eficacia terapéutica de los anticuerpos neutralizantes.

El sujeto al que pueden administrarse composiciones de anticuerpos anti-PG puede ser un mamífero tal como un mamífero no primate (por ejemplo, vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, etc.) o un primate (por ejemplo, mono, chimpancé, simio o ser humano). El sujeto puede ser un ser humano, tal como un paciente adulto o un paciente pediátrico.

Para fines de tratamiento o de prevención del cáncer de mama metastásico o la prevención de la recurrencia del cáncer de mama pueden administrarse composiciones de anticuerpos anti-PG solas a los sujetos como monoterapia o como complemento para uno o más tratamientos primarios eficaces para tratar o prevenir el cáncer de mama metastásico o para prevenir la recurrencia del cáncer de mama.

Por lo tanto, en determinadas formas de realización de la presente divulgación, las composiciones de anticuerpos anti-hPG pueden administrarse a un sujeto con necesidad de tratamiento o de prevención del cáncer de mama metastásico como complemento a la quimioterapia, como complemento a la radioterapia, como complemento al tratamiento biológico, como complemento al tratamiento hormonal, como complemento al tratamiento quirúrgico o como complemento a otros tipos de tratamiento con anticuerpos eficaces para tratar o prevenir el cáncer de mama metastásico. En otras formas de realización, las composiciones de anticuerpos anti-hPG pueden administrarse a un sujeto con necesidad de prevención de la recurrencia del cáncer de mama como complemento a otros tratamientos eficaces para prevenir dicha recurrencia.

Como tratamiento complementario, las composiciones de anticuerpos anti-hPG pueden administrarse concurrentemente, sucesivamente o de forma separada al tratamiento principal.

Las composiciones de anticuerpos anti-hPG y el tratamiento principal se administran concurrentemente cuando se administran al mismo tiempo, incluso cuando las respectivas administraciones se solapan, pero comienzan o terminan en momentos diferentes. Ejemplos no limitativos de administración concurrente es la administración de una composición de anticuerpos anti-hPG en el mismo momento que un sujeto recibe quimioterapia para el cáncer de mama metastásico o se somete a extirpación quirúrgica de un tumor de mama primario.

Las composiciones de anticuerpos anti-hPG y el tratamiento principal se administran sucesivamente cuando se administran a un sujeto el mismo día, por ejemplo durante la misma visita clínica, pero no concurrentemente. La administración sucesiva puede tener lugar con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más horas de diferencia. El tratamiento principal puede administrarse en primer lugar, seguido de la administración de la composición de anticuerpos anti-hPG. En una forma de realización alternativa, la composición de anticuerpos anti-hPG puede administrarse en primer lugar, seguida del tratamiento principal.

Las composiciones de anticuerpos anti-hPG y el tratamiento principal se administran por separado cuando se administran a un sujeto en días diferentes. En determinadas formas de realización, la composición de anticuerpos anti-hPG y el tratamiento principal pueden administrarse en un intervalo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, una semana, 2 semanas, 3 semanas o un mes o más. Como con la administración sucesiva, la administración de la composición de anticuerpos anti-hPG puede preceder o seguir a la administración separada del tratamiento principal.

En otras determinadas formas de realización de la presente divulgación, una composición de anticuerpos anti-hPG y el tratamiento principal pueden administrarse repetidamente con un patrón alterno, tanto si se administran sucesivamente como por separado.

En determinadas formas de realización, la administración de una composición de anticuerpos anti-hPG como complemento a un tratamiento principal puede proporcionar un efecto superior al aditivo, o sinérgico, proporcionando un beneficio terapéutico cuando ninguna de los tratamientos podría administrarse individualmente en una cantidad que fuera terapéuticamente eficaz sin incurrir en efectos secundarios inaceptables. En estas circunstancias, la composición de anticuerpos anti-hPG y/o el tratamiento principal pueden administrarse en cantidades más pequeñas, reduciendo de esta forma la posibilidad de aparición de efectos adversos o la gravedad de los mismos. No obstante, no se requiere un efecto sinérgico para que un tratamiento complementario con una composición de anticuerpos anti-hPG sea terapéuticamente eficaz.

10. Procedimientos para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento del cáncer de mama metastásico

Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer de mama primario y/o metastásico tienen niveles de PG en plasma y/o suero elevados mientras que el nivel de referencia de PG en individuos sanos es despreciable. Los niveles de PG en plasma y/o suero en sujetos con cáncer de mama primario y/o metastásico pueden medirse, y para el cáncer de mama metastásico son de aproximadamente 25 pM o superiores. Basándose en esta observación, los niveles de PG en plasma y/o suero pueden utilizarse, entre otras aplicaciones, para realizar un seguimiento de la eficacia de tratamientos contra el cáncer de mama primario y/o metastásico, detectar y diagnosticar la presencia de cáncer de mama primario y/o metastásico y seleccionar sujetos que podrían beneficiarse del tratamiento con anticuerpos anti-PG.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona procedimientos para realizar un seguimiento de un sujeto que está siendo tratado contra el cáncer de mama metastásico para determinar la eficacia de una ronda previa de tratamiento de cáncer de mama metastásico. Estos procedimientos pueden utilizarse para cualquier tipo de tratamiento contra el cáncer de mama metastásico, utilizándolos solos, o en combinación con otros, que incluyen, pero sin limitación, administración de una composición de anticuerpos anti-hPG, tratamiento con otros tipos de anticuerpos, quimioterapia, radioterapia, tratamiento hormonal, tratamiento biológico, etc. Después de completar una ronda de tratamiento, el equipo de tratamiento responsable de las necesidades de atención de un sujeto precisa comprobar si esta ha sido eficaz para determinar si se administra una nueva ronda de tratamiento o no y tomar otras decisiones clínicas.

En algunas formas de realización de los procedimientos de seguimiento, la concentración de PG en uno o más fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero y otros, puede medirse antes de iniciar un tratamiento del cáncer de mama metastásico y después compararla con el nivel de PG medido en el mismo tipo de fluido corporal algún tiempo después de completar el tratamiento. En otras formas de realización, se miden niveles de PG en un tejido de interés, tal como biopsias de un cáncer de mama.

Una reducción de la concentración de PG es indicativa de eficacia. Normalmente, cuando mayor sea la magnitud de la reducción de PG después del tratamiento, mayor será la eficacia del tratamiento. Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se cree que como el número y/o el tamaño de las metástasis en un paciente se reduce como resultado de un tratamiento eficaz, la cantidad total de PG producida por la metástasis también se reduce. Por el contrario, una carencia en la reducción o un aumento en los niveles de PG después de completar el tratamiento puede indicar que el tratamiento no es eficaz. En base a esta información, el equipo de tratamiento puede decidir si se inicia una nueva ronda de tratamiento.

Los intervalos adecuados después de completar una ronda de tratamiento antes de los cuales se toman muestras para realizar un seguimiento se determinarán fácilmente por los expertos en la materia, y dependerán de variables tales como el tipo de tratamiento en cuestión, el sexo y la edad del sujeto y otros factores. Los intervalos ejemplificativos incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 semanas y 3, 4, 5 o 6 meses después de completar una ronda de tratamiento antes de tomar muestras para su utilización en los procedimientos de seguimiento de la presente divulgación. También son posibles otros intervalos. En otras formas de realización, pueden tomarse múltiples mediciones a intervalos diferentes después de completar el tratamiento, y después se grafican para determinar si existe una tendencia. En un ejemplo no limitativo, pueden determinarse niveles de PG semanalmente o mensualmente durante los primeros seis meses después de concluir una ronda de tratamiento. También son posibles otros intervalos.

Los niveles de concentración de PG en fluidos corporales pueden medirse utilizando técnicas analíticas familiares para los expertos en la materia, tales como, pero sin limitación, RIA y ELISA. Los procedimientos de ensayo, tales como los anteriores, que dependen de anticuerpos específicos para hPG, pueden llevarse a cabo utilizando anticuerpos no neutralizantes o neutralizantes, tales como los divulgados en la presente memoria, de acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia.

En una forma de realización específica, los niveles de PG pueden medirse utilizando un ELISA de tipo sándwich con un anticuerpo anti-PG dirigido al extremo N-terminal de la progastrina y un segundo anticuerpo anti-PG dirigido al extremo C-terminal de la progastrina. Los anticuerpos anti-PG N-terminales y C-terminales ejemplificativos útiles para dicho ensayo de tipo sándwich se describen en una sección posterior. En dicho ensayo, se prepara una superficie, tal como los pocillos de una placa de 96 pocillos, a la que se une una cantidad conocida de un primer anticuerpo de "captura" anti-PG N-terminal o C-terminal. Después se aplica una muestra de ensayo a la superficie y se continúa con un periodo de incubación. La superficie se lava después para eliminar el antígeno no unido y se aplica una solución que contiene un segundo anticuerpo anti-PG "de detección", anticuerpo de detección que se une a un epítipo diferente de PG (por ejemplo, si el anticuerpo de captura es un anticuerpo anti-PG C-terminal, se utiliza un anticuerpo anti-PG N-terminal como anticuerpo de detección, y viceversa). Los niveles de PG se miden después o bien directamente (si, por ejemplo, el anticuerpo de detección está conjugado a una marca detectable) o bien indirectamente (a través de un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo anti-PG de detección). Un ensayo de tipo sándwich específico para la medición de niveles de PG en plasma y/o suero se proporciona en el Ejemplo 11.

En una forma de realización alternativa de los procedimientos de la presente divulgación, puede realizarse un seguimiento de la eficacia de administración de una composición de anticuerpos anti-hPG a un sujeto sobre la reducción de niveles de PG en un fluido corporal de interés. En estos procedimientos, pueden tomarse muestras a lo largo del tiempo y graficar las concentraciones de PG para evaluar tendencias. Cuando hay presencia de anticuerpos anti-hPG residuales, los datos pueden mostrar una reducción en los niveles de PG debido al secuestro de PG por los anticuerpos, seguida de un aumento cuando este efecto disminuye, seguido de una reducción subsiguiente si el tratamiento ha sido eficaz para tratar cáncer de mama metastásico.

Según otras formas de realización de los procedimientos de la presente divulgación, una concentración de PG en sangre, suero o plasma inferior a un umbral predeterminado de menos de aproximadamente 50 pM, 40 pM, 30

pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM o inferior es indicativa de eficacia en el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Otros umbrales de concentración de PG indicativos de la eficacia también son posibles y los podrán determinar fácilmente los expertos en la materia.

5 11. Procedimientos de determinación de la presencia de cáncer de mama

La presente divulgación también proporciona determinadas formas de realización según las cuales pueden analizarse sujetos para determinar si tienen niveles de PG elevados en un fluido corporal, tal como sangre, plasma, suero, etc., en comparación con un valor de referencia apropiado, con el fin de detectar la presencia de
10 cáncer de mama o la recurrencia del cáncer de mama después del tratamiento.

En determinadas formas de realización de los procedimientos de la presente divulgación, el sujeto puede ser uno en el que se desea determinar si el cáncer de mama, primario o metastásico, está presente en el mismo. En dichos sujetos, niveles de PG elevados con respecto al valor de referencia indican que hay presencia de cáncer de mama. Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se cree que cuando el tamaño y/o la extensión del cáncer de mama en un sujeto aumentan, los niveles de PG sistémicos y/o localizados también aumentan en el sujeto.
15

En otras formas de realización, el sujeto puede ser uno que se ha tratado previamente de cáncer de mama primario en el que se desea determinar si el cáncer de mama se ha metastatizado a tejidos u órganos distantes. En dichos sujetos, niveles de PG elevados con respecto al valor de referencia indican que hay presencia de cáncer de mama metastásico. En dichos sujetos, los procedimientos de la presente divulgación también son útiles, entre otras cosas, para determinar si un tratamiento con el que se pretendía prevenir el cáncer de mama metastásico ha sido eficaz o no. Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se cree que cuando el número y/o el tamaño de las metástasis en un sujeto aumentan, los niveles de PG sistémicos y/o localizados también aumentan en el sujeto.
20
25

Según otras formas de realización más, el sujeto puede ser uno que se ha tratado previamente de cáncer de mama, primario o metastásico, en el que el cáncer aparentemente ha desaparecido y en el que se desea determinar si el cáncer de mama ha recurrido o aparecido de nuevo. En dichos sujetos, niveles de PG elevados con respecto al valor de referencia indican que el cáncer de mama ha recurrido. Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se cree que cuando el tamaño y/o la extensión del cáncer de mama recurrente en un sujeto aumentan, los niveles de PG sistémicos y/o localizados también aumentan en el sujeto.
30

En vista de los descubrimientos descritos en la presente memoria de que determinados cánceres de mama primarios y metastásicos segregan PG y de que determinadas células del cáncer de mama son sensibles a PG, la presente divulgación también proporciona procedimientos para seleccionar sujetos que puedan beneficiarse de un tratamiento de administración de anticuerpos anti-PG. Por lo tanto, los sujetos pueden cribarse por profesionales de la salud para detectar si tienen niveles de PG elevados en sangre con respecto al valor de referencia. Una vez se han identificado dichos sujetos, los profesionales de la salud pueden ordenar ensayos adicionales, tales como una mamografía, para confirma la presencia de cáncer de mama en el sujeto. Si el cáncer de mama se confirma, puede comenzar un tratamiento, incluida la administración de anticuerpos anti-hPG.
35
40

En determinadas formas de realización de los procedimientos para seleccionar sujetos, el cribado puede realizarse como parte de un chequeo rutinario por parte del médico de atención primaria del sujeto o como parte de iniciativas de salud pública dirigidas a grandes poblaciones de sujetos. En otras formas de realización, los sujetos que se van a cribar son miembros de subpoblaciones particulares con un riesgo promedio más elevado de desarrollar cáncer de mama. Dichos grupos incluyen, pero sin limitación, sujetos que tienen mutaciones en el gen BRCA1, el gen BRCA2 u otros genes asociados con un riesgo aumentado de padecer cáncer de mama. Otros grupos incluyen sujetos con anomalías de mama no malignas, tales como carcinoma ductal *in situ* (DCIS) o carcinoma lobular *in situ* (LCIS), sujetos que tienen un familiar de primer grado (hermana, madre, hija) al que se ha diagnosticado cáncer de mama, sujetos expuestos a irradiación en el pecho, sujetos que experimentan menarquía precoz, menopausia tardía o una edad avanzada para el primer parto, sujetos que utilizan píldoras para el control de la natalidad, sujetos que tienen un índice de masa corporal elevado o sujetos que tienen una dieta rica en grasas o que consumen alcohol. Otros grupos más incluyen sujetos a los que se ha diagnosticado previamente y se ha tratado exitosamente cáncer de mama.
45
50
55

En otras formas de realización más de los procedimientos para seleccionar sujetos, los sujetos que se van a cribar son aquellos que han recibido resultados de una prueba de diagnóstico de cáncer de mama en los que no se puede ni afirmar ni excluir definitivamente la presencia de cáncer de mama. El cribado por niveles de PG elevados puede proporcionar información adicional que se utiliza por parte de los profesionales de la salud para mejorar la exactitud de un diagnóstico. Un ejemplo no limitativo de dichos sujetos sería aquellos que reciben el resultado de una mamografía no concluyente, ambigua o difícil de leer.
60
65

Las concentraciones de PG pueden medirse utilizando técnicas familiares para los expertos en la materia, tales

como, pero sin limitación, RIA y ELISA. Los procedimientos de ensayo, tales como los anteriores, que dependen de anticuerpos específicos para hPG pueden llevarse a cabo utilizando anticuerpos no neutralizantes o neutralizantes, tales como los divulgados en la presente memoria, de acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia.

5 Sobre la base de la detección de niveles de PG elevados utilizando los procedimientos de la presente divulgación, el equipo de tratamiento puede decidir entonces si se realizan pruebas adicionales para confirmar la presencia de cáncer de mama o la recurrencia del cáncer de mama después de un tratamiento, o se procede directamente a tratar al sujeto.

10 Pueden utilizarse diferentes valores de referencia frente a los que se comparan los niveles de PG medidos en un sujeto. En algunas formas de realización de los procedimientos de la presente divulgación, el valor de referencia se establece midiendo niveles de PG en un fluido corporal de interés tomado del mismo sujeto en puntos temporales previos. Dichas muestras pueden tomarse, y medirse los niveles de PG, a intervalos predeterminados. En un ejemplo no limitativo, los niveles de PG se miden semanalmente o mensualmente durante los primeros seis meses después de finalizar un tratamiento, después una vez cada tres meses hasta que se cumplan dos años después de la finalización del tratamiento y, a continuación, cada seis meses o cada año después de dicha fecha. También son posibles otros intervalos predeterminados.

20 En otras formas de realización de los procedimientos de la presente divulgación, el valor de referencia puede establecerse a partir de niveles de PG promedio en una población de individuos con características similares a aquellos sujetos a los que se ha tomado muestras para detectar cáncer de mama o la recurrencia del cáncer de mama. Dichas características pueden incluir, pero sin estar necesariamente limitadas a las mismas, sexo, edad, estadio del tumor de mama primario, exposición previa a determinados tratamientos, o combinaciones de estos y otros factores. En otras formas de realización más, pueden utilizarse en la evaluación de la condición de un sujeto tanto un valor de referencia específico de un sujeto como también un valor de referencia derivado de una población.

30 De acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia, se concluye que los niveles de PG en muestras de un sujeto que superan un determinado umbral con respecto al valor de referencia indican la presencia de cáncer de mama, cáncer de mama que ha recurrido después de tratamiento o que un sujeto puede obtener un beneficio terapéutico del tratamiento con anticuerpos anti-hPG. El equipo de tratamiento puede realizar a continuación pruebas confirmatorias para confirmar la presencia de cáncer de mama o de cáncer de mama recurrente. Los ejemplos no limitativos de dichos ensayos incluyen cirugía exploratoria, técnicas de imagenología tales como mamografía y ensayos para determinar la presencia en sangre u otros tejidos de factores biológicos producidos por cánceres de mama.

40 Debido a que la ingesta de alimentos aumenta habitualmente la síntesis y la secreción de gastrina, la ingesta de alimentos puede tener como consecuencia aumentos transitorios en niveles de PG en sangre que pueden interferir con la medición precisa de PG producida por metástasis de cáncer de mama o cáncer de mama recurrente. Para evitar este efecto, en particular cuando se van a determinar niveles de PG en plasma y/o suero, se pueden tomar muestras de sujetos después de que hayan ayunado durante un periodo de tiempo suficiente, que puede determinarse fácilmente por parte de los expertos en la materia.

45 12. Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-PG para su utilización en los procedimientos de la presente divulgación pueden formularse en forma de composiciones. Opcionalmente, las composiciones pueden comprender uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterápicos u otros anticuerpos con eficacia terapéutica contra el cáncer de mama metastásico o la recurrencia del cáncer de mama. Las composiciones se administrarán habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar presente en cualquier forma adecuada en función del procedimiento de administración deseado a un paciente.

55 Los anticuerpos anti-PG pueden administrarse a un sujeto utilizando una diversidad de vías, normalmente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. La administración puede efectuarse en forma una o más inyecciones en embolada, o en forma de una o más infusiones. También son posibles otras vías de administración de acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia. La vía más adecuada de administración en cualquier caso dado dependerá de la composición particular que se va a administrar y de las características del sujeto, tales como la edad o el sexo.

60 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unidad que contienen una cantidad predeterminada de un anticuerpo anti-hPG de la divulgación por dosis. Dicha unidad puede contener, por ejemplo, pero sin limitación, de 5 mg a 5 g, por ejemplo de 10 mg a 1 g, o de 20 a 50 mg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su utilización en la divulgación pueden adquirir una amplia diversidad de formas en función, por ejemplo, de la vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden prepararse para su almacenamiento como formulaciones liofilizadas o solución acuosas mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales que se emplean normalmente en la técnica (todos los cuales se denominan en la presente memoria "vehículos"), es decir, agentes tampón, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros diversos aditivos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para el receptor en las dosis y concentraciones empleadas.

Los agentes tampón ayudan a mantener el pH en un intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes en concentraciones que varían de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tampón adecuados para su utilización en la presente divulgación incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato de monosodio-citrato de disodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de trisodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de monosodio, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato de monosodio, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-succinato de disodio, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato de monosodio, mezcla de ácido fumárico-fumarato de disodio, mezcla de fumarato de monosodio-fumarato de disodio, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), tampón de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente también pueden utilizarse tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Pueden añadirse conservantes para retrasar el crecimiento microbiano y pueden añadirse en cantidades que varían del 0,2% al 1% (p/v). Los conservantes adecuados para su utilización en la presente divulgación incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil-parabeno, propil-parabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro) de benzalconio, cloruro de hexametonio y alquil-parabenos tales como metil-parabeno y propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Pueden añadirse isotonicantes, conocidos a veces como "estabilizantes" para asegurar la isotonicidad de composiciones líquidas de la presente divulgación, e incluyen alcoholes de azúcar polihidroxílicos, por ejemplo alcoholes de azúcar trihidroxílicos o con más de tres grupos hidroxilo, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol y manitol. Estabilizantes se refiere a una categoría amplia de excipientes que pueden variar en su función desde un agente de carga a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir su desnaturalización o la adherencia del mismo a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihidroxílicos (expuestos anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares o alcoholes de azúcar orgánicos, tales como lactosa, trehalosa, estaquirosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluidos ciclitos tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 partes en peso por cada parte en peso de proteína activa.

Pueden añadirse tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como a proteger la proteína terapéutica frente a la agregación inducida por agitación que también permite que la formulación se exponga a una superficie de cizallamiento sometida a esfuerzos sin causar la desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles pluriónicos, polioxietileno-sorbitano-monoésteres (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. No obstante, los tensioactivos tienen la tendencia de unirse a anticuerpos y pueden afectar a sus conformaciones. Por lo tanto, cuando se utilizan, las concentraciones de estabilizantes deberían ser bajas y determinarse experimentalmente.

Los diversos excipientes adicionales pueden incluir agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y codisolventes.

Los anticuerpos anti-hPG pueden administrarse individualmente o en forma de mezclas de uno o más

anticuerpos anti-hPG solos o en mezcla o combinación con otros agentes útiles en la prevención de la metástasis o la recurrencia del cáncer de mama, incluidos, pero sin limitación, agentes quimioterápicos, agentes de tratamiento hormonal, agentes de tratamiento biológico y agentes de tratamiento con anticuerpos (por ejemplo, bevacizumab).

5

13. Kits farmacéuticos

Determinadas formas de realización proporcionan kits farmacéuticos para su utilización por médicos u otros profesionales. El kit farmacéutico es un envase que comprende un anticuerpo anti-hPG de la divulgación (por ejemplo, en forma liofilizada o como solución acuosa) y uno o más de los siguientes: por lo menos un segundo agente terapéutico descrito en otra parte de la presente divulgación, un dispositivo para administrar el anticuerpo anti-hPG, por ejemplo, una aguja y/o una jeringa; y agua de grado farmacéutico o tampón para resuspender o diluir el anticuerpo si el anticuerpo se encuentra en forma liofilizada o concentrada. Los kits también pueden incluir instrucciones para preparar la composición de anticuerpos y/o administrar la composición a un paciente.

15

Cada dosis unidad de la composición de anticuerpos anti-hPG puede envasarse por separado, y un kit puede contener una o más dosis unidad (por ejemplo, dos dosis unidad, tres dosis unidad, cuatro dosis unidad, cinco dosis unidad, siete dosis unidad, ocho dosis unidad, diez dosis unidad, o más). En una forma de realización, las, una o más, dosis unidad están alojadas cada una en una jeringa, y en otra forma de realización, las, una o más, dosis unidad están cada una contenidas en una bolsa o receptáculo similar adecuado para conectar a una línea I.V.

20

14. Dosis eficaces

Las composiciones que comprenden anticuerpos anti-hPG neutralizantes de la presente divulgación son generalmente para su administración a un sujeto con necesidad de tratamiento o de prevención de metástasis del cáncer de mama o prevención de la recurrencia del cáncer de mama en una dosificación eficaz para lograr, por lo menos parcialmente, el resultado deseado.

25

Con respecto al tratamiento de metástasis del cáncer de mama, beneficio terapéutico significa, entre otras cosas, cualquier mejora del cáncer de mama metastásico, la detención o la ralentización de las metástasis del cáncer de mama, la reducción del número y/o del tamaño de dichas metástasis dentro de un sujeto, la reducción del flujo de sangre a las metástasis del cáncer de mama, la reducción del metabolismo de las metástasis del cáncer de mama, la reducción de la gravedad del cáncer metastásico de mama, la inhibición de la proliferación, o el aumento, de la apoptosis de células del cáncer de mama metastásico, la detención o el retardo del agravamiento de los síntomas o signos asociados con el cáncer de mama metastásico en un sujeto, permitir la extirpación quirúrgica de metástasis del cáncer de mama cuando dicha extirpación no habría sido posible antes del tratamiento, el aumento de la esperanza de vida, de la comodidad o la calidad de vida de un sujeto que padece cáncer de mama metastásico, o la reducción del dolor en dicho sujeto. Una cura completa del cáncer de mama metastásico, aunque deseable, no es necesaria para que exista un beneficio terapéutico.

30

35

40

El tamaño, el número y el metabolismo de los tumores del cáncer de mama metastásico pueden medirse utilizando diversas técnicas de barrido, incluidas, pero sin limitación, CT, MRI, MRI funcional, SPECT y PET, así como otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

45

El beneficio terapéutico también puede correlacionarse con uno o más puntos finales sustitutivos. A modo de ejemplo, no de limitación, la producción de determinadas proteínas u otros factores de cánceres de mama metastásicos, tales como progastrina o antígeno carcinoembrionario (CEA), pueden medirse en un sujeto a lo largo del tiempo, siendo una reducción en los niveles del factor indicativa de beneficio terapéutico.

50

Con respecto a la prevención de la metástasis del cáncer de mama, una dosificación eficaz es una que es eficaz para prevenir por lo menos parcialmente el cáncer de mama metastásico, como se evidencia, entre otras cosas, por la ausencia de metástasis del cáncer de mama, el retardo, la detención o la ralentización del crecimiento de metástasis del cáncer de mama, la reducción del número y/o el tamaño de cualesquiera metástasis de mama que pueda ocurrir en último término, y la inhibición de, o la interferencia con, cualquiera de las etapas mecánicas por las que las células del cáncer de mama metastásico sean capaces de extenderse a partir del tumor primario. La prevención completa de la metástasis del cáncer de mama, aunque deseada, no es necesaria para que exista eficacia.

55

Con respecto a la prevención de la recurrencia del cáncer de mama, una dosificación eficaz es una que es eficaz para prevenir por lo menos parcialmente la recurrencia del cáncer de mama, como se evidencia, entre otras cosas, por la ausencia de recurrencia de cáncer de mama, el mantenimiento de la remisión del cáncer de mama, o el retardo, la detención o la ralentización de la reaparición o el recrecimiento del cáncer de mama, o el crecimiento de un nuevo tumor de mama, en un sujeto después de un tratamiento en el que el cáncer de mama inicial se había vuelto indetectable o, aparentemente, había desaparecido. La eficacia de prevención de la recurrencia del cáncer de mama también se evidencia, entre otras cosas, por la destrucción de las células madre

65

del cáncer de mama, el retardo, la detención, la inhibición o la ralentización del crecimiento o la proliferación de células madre del cáncer de mama, el aumento de la apoptosis de células madre del cáncer de mama, o por causar la diferenciación de células madre de cáncer de mama en células que no son capaces de contribuir a la formación o el crecimiento de cáncer de mama. Tal como se describe en otra parte del presente documento, las células madre del cáncer de mama se pueden identificar porque tienen uno o más atributos fenotípicos característicos de dichas células que incluyen, pero sin limitación, la expresión de determinados marcadores celulares, la capacidad de crecer en forma de esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia y la capacidad de iniciar el crecimiento de nuevos tumores después de un trasplante. La prevención completa de la recurrencia del cáncer de mama, aunque deseada, no es necesaria para que exista eficacia.

La unión a toda la progastina no se requiere necesariamente para lograr eficacia terapéutica. Más bien, la reducción de la concentración de progastina dentro de un tumor, sistémicamente, en particular en fluidos corporales tales como líquido ascítico, fluido de efusiones pleurales, líquido cefalorraquídeo, linfa, sangre, plasma, suero o cualquier otro, también puede ser eficaz.

De acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia, la dosis de una composición de anticuerpos anti-hPG puede valorarse en un paciente con el fin de reducir la concentración de hPG libre en un tejido o un fluido corporal de interés en un momento determinado después de la administración en por lo menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90 o el 100%, o aproximadamente el 5%-10%, aproximadamente el 10%-15%, aproximadamente el 15%-20%, aproximadamente el 20%-25%, aproximadamente el 25%-30%, aproximadamente el 30%-35%, aproximadamente el 35%-40%, aproximadamente el 40%-45%, aproximadamente el 45%-50%, aproximadamente el 50%-55%, aproximadamente el 55%-60%, aproximadamente el 60%-65%, aproximadamente el 65%-70%, aproximadamente el 70%-75%, aproximadamente el 75%-80%, aproximadamente el 80%-85%, aproximadamente el 85%-90%, o aproximadamente el 90%-95%, o lograr un porcentaje de reducción de la concentración de hPG libre que varíe entre cualquiera de los valores anteriores.

La cantidad de anticuerpo anti-hPG administrado dependerá de una diversidad de factores, incluidos el tamaño y el peso del sujeto que se va a tratar, la forma, la vía y el sitio de administración, el régimen terapéutico (por ejemplo si se utiliza un segundo agente terapéutico), la edad y la condición del sujeto particular que se está tratando, el nivel de PG detectado en la sangre de dicho sujeto antes del tratamiento, la sensibilidad del sujeto que se está tratando con anticuerpos anti-PG. La dosis apropiada puede determinarla fácilmente un experto en la materia. En último término, un médico determinará las dosis apropiadas que se van a utilizar. Esta dosis puede repetirse tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, puede modificarse o reducirse la cantidad y/o la frecuencia de la dosis de acuerdo con la práctica clínica normal. La dosis y el régimen de tratamiento apropiados pueden establecerse realizando un seguimiento del progreso del tratamiento utilizando los procedimientos de la presente divulgación u otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

Las dosis eficaces pueden estimarse inicialmente mediante ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis inicial para su utilización en animales para lograr una concentración de anticuerpos anti-hPG en sangre o suero en circulación que corresponda a la afinidad de unión del anticuerpo por la progastina medida *in vitro*, o que sea superior a la misma. El cálculo de dosis para lograr dichas concentraciones en sangre o suero en circulación tomando en consideración la biodisponibilidad del anticuerpo particular se encuentra dentro de la capacidad del experto. Para mayor orientación, remítase a la Parte 1: Principios Generales en "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics," 11ª ed., Hardman, J.G., *et al.*, Eds., McGraw-Hill Professional, y las referencias citadas en el mismo. Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. Los expertos pueden adaptar de forma rutinaria dicha información para determinar dosis adecuadas para su administración a seres humanos.

En formas de realización específicas, puede determinarse una dosis i.v. para un sujeto individual midiendo la concentración de PG en suero o plasma del individuo unas pocas veces de unos pocos días a unas pocas semanas antes del tratamiento y calculando una cantidad de anticuerpo anti-PG que fuera de saturación, es decir, una cantidad que sería suficiente para unirse a la totalidad de la PG. Como apreciará el experto, la cantidad de cualquier anticuerpo específico necesaria para lograr la saturación para una concentración de PG en suero o plasma dependerá, en parte, de la constante de afinidad del anticuerpo particular. Los procedimientos para calcular cantidades de saturación para anticuerpos anti-PG específicos de interés son bien conocidos.

Para asegurar la saturación, puede administrarse una cantidad que sea superior a la cantidad de saturación calculada, por ejemplo, puede administrarse una cantidad por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10 veces superior a la cantidad de saturación calculada. Para vías de administración diferentes a la vía i.v., la cantidad puede ajustarse sobre la base de farmacocinética y biodisponibilidad, como se sabe en la técnica.

La dosis eficaz de una composición de anticuerpos anti-hPG puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg por administración individual (por ejemplo, inyección en embolada), administraciones múltiples o administración continua (por ejemplo infusión), o cualquier intervalo o valor eficaz del mismo dependiendo del tipo de cáncer cuya recurrencia se busca prevenir, la vía de administración y la edad,

el peso y la condición del sujeto. En determinadas formas de realización, cada dosis puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg; de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg; de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg; aproximadamente 2 mg/kg; de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg; de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg; de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 3,5 mg/kg; de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg; de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg; de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg; de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg; de aproximadamente 6 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg; de aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg; de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg; de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg; de aproximadamente 12,5 mg/kg a aproximadamente 17,5 mg/kg; de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg; de aproximadamente 17,5 mg/kg a aproximadamente 22,5 mg/kg; de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg; de aproximadamente 22,5 mg/kg a aproximadamente 27,5 mg/kg; de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg; de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg; de aproximadamente 35 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg; de aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; de aproximadamente 45 mg/kg a aproximadamente 55 mg/kg; de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg; de aproximadamente 55 mg/kg a aproximadamente 65 mg/kg; de aproximadamente 60 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg; de aproximadamente 65 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg; de aproximadamente 70 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg; de aproximadamente 75 mg/kg a aproximadamente 85 mg/kg; de aproximadamente 80 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg; de aproximadamente 85 mg/kg a aproximadamente 95 mg/kg; de aproximadamente 90 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; de aproximadamente 95 mg/kg a aproximadamente 105 mg/kg; de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg; de aproximadamente 125 mg/kg a aproximadamente 175 mg/kg; de aproximadamente 150 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg; de aproximadamente 175 mg/kg a aproximadamente 225 mg/kg; de aproximadamente 200 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg. También son posibles otros intervalos de dosificación.

La cantidad, la frecuencia y la duración de la administración dependerán de una diversidad de factores, tales como la edad, el peso y la afección patológica del paciente. Así, en ejemplos no limitativos, un régimen terapéutico para administración puede continuar durante 1 día o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 1 semana o más, 2 semanas a indefinidamente, durante 2 semanas a 6 meses, de 3 meses a 5 años, de 6 meses a 1 o 2 años, de 8 meses a 18 meses, o similares. Opcionalmente, el régimen terapéutico proporciona una administración repetida, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, cada dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas o un mes. La administración repetida puede ser en la misma dosis o a una dosis diferente. La administración puede repetirse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más. Una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo anti-hPG puede administrarse como una dosis individual o a lo largo del transcurso del régimen terapéutico, por ejemplo, a lo largo del transcurso de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, un año o más.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión del gen de la gastrina en estirpes celulares de cáncer de mama metastásico

Este ejemplo describe la expresión del gen de la gastrina (GAST) en estirpes celulares de cáncer de mama metastásico.

A. Procedimientos

La expresión del ARNm del GAST se cuantificó utilizando RT-PCR cuantitativa a partir de preparaciones de ARN de las estirpes celulares MCF-7, MDA-MB-231 y T47D. Los datos se expresan en comparación con el nivel de expresión de ARNm encontrado en la línea celular SW480, una línea celular de cáncer colorrectal primario que se sabe que expresa niveles elevados de ARNm de gastrina.

Las células MCF-7 son una línea celular de cáncer de mama metastásico humano. Se derivaron originariamente de un derrame pleural de un paciente al que se le había diagnosticado adenocarcinoma de mama. Las células MDA-MB-231 son una línea celular de cáncer de mama metastásico humano. Se derivaron originariamente de un derrame pleural de un paciente al que se le había diagnosticado adenocarcinoma de mama. Las células T47D son una línea celular de cáncer de mama metastásico humano. Se derivaron originariamente de un derrame pleural de un paciente al que se le había diagnosticado un carcinoma ductal de mama.

B. Resultados

Los niveles de expresión del gen de la gastrina medidos mediante RT-PCR cuantitativa se muestran en la figura 1. Las tres estirpes celulares de cáncer de mama metastásico analizadas expresaron el gen de la gastrina a niveles aproximadamente iguales o inferiores en comparación con la expresión en células SW480. Mediante procesamiento postraduccional, el producto del gen de la gastrina puede convertirse en progastrina.

Ejemplo 2: Expresión del gen de la gastrina en tumores de mama primarios y metastásicos extirpados quirúrgicamente de pacientes

5 Este ejemplo describe la expresión del gen de la gastrina (GAST) en cánceres de mama primarios y metastásicos extirpados quirúrgicamente de pacientes.

A. Procedimientos

10 Los cánceres de mama primarios y metastásicos se extirparon quirúrgicamente de diferentes pacientes según directrices éticas aplicables. Se preparó ARN de las muestras de cáncer y se midió el ARNm de la gastrina mediante RT-PCR cuantitativa. La expresión de ARNm de gastrina en muestras clínicas se normalizó con respecto al nivel de expresión en células MCF-7.

B. Resultados

15 Se analizaron un total de 105 cánceres de mama primarios y 25 cánceres de mama metastásicos para determinar la expresión del gen de la gastrina. Se pudo detectar ARNm de progastrina en 27 de los tumores primarios analizados (Fig. 2) y en 7 de los tumores metastásicos analizados (Fig. 3). Por lo tanto, el gen de la gastrina se expresa en un subconjunto de cánceres de mama tanto primarios como secundarios y el nivel de expresión varía entre los cánceres en los que la expresión del gen de la gastrina es detectable.

Ejemplo 3: Concentraciones de progastrina en plasma sanguíneo en pacientes con cáncer de mama

25 Este ejemplo describe la cuantificación de niveles de progastrina en plasma sanguíneo en paciente con cáncer de mama primario y metastásico.

A. Procedimientos

30 Se midieron concentraciones de progastrina en plasma sanguíneo en individuos sanos, como control, y en 42 pacientes con cáncer de mama metastásico a quienes se les habían extirpado quirúrgicamente los tumores primarios y en 3 pacientes con cáncer de mama primario. Se obtuvieron un total de 104 muestras de control sanas de un banco de sangre.

35 La cuantificación de niveles de progastrina en plasma o suero se realizó utilizando una técnica de ELISA de tipo sándwich específica de progastrina similar a la que se describe de forma predictiva más adelante.

40 Los pocillos de placas Nunc MaxiSORP de 96 pocillos se recubren con un primer anticuerpo específico de progastrina de la forma siguiente. Se diluyen anticuerpos policlonales anti-progastrina para la región carboxi-terminal de la progastrina a una concentración de 3 µg/ml en una solución 50 mM, pH 9,6, de tampón de carbonato/bicarbonato de sodio en agua MilliQ. A continuación se añaden un total de 100 µl de la solución de anticuerpos a cada uno de los pocillos de las placas de 96 pocillos y se incuban durante toda la noche a 4°C. Después de la unión, la solución de anticuerpos se retira de los pocillos, que se lavan después tres veces con 100 µl de tampón de lavado (1X PBS / 0,1% de Tween-20). A continuación se añaden 100 µl de tampón de bloqueo (1X PBS / 0,1% de Tween-20 / 0,1% de BSA) a cada pocillo y se incuban durante 2 horas a 22°C. A continuación se retira el tampón de bloqueo y los pocillos se lavan tres veces con tampón de lavado. A continuación se añaden muestras de plasma o suero aisladas de pacientes a los pocillos a un volumen de 100 µl en una serie de diluciones, normalmente diluciones 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10 y después se incuban durante 2 horas a 22°C. Las muestras de plasma o suero se analizan por duplicado.

50 Los ensayos también incluyen dos curvas estándar. La primera curva estándar se prepara utilizando diluciones de progastrina recombinante a una cantidad final de 1 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,1 ng, 0,05 ng, 0,01 ng y 0 ng por pocillo. La segunda curva estándar, que sirve como control negativo, se prepara a partir de suero humano negativo a progastrina diluido en tampón de bloqueo en las mismas diluciones que las muestras de ensayo, es decir, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10. Como alternativa, cuando las muestras de plasma se están analizando, la segunda curva estándar, que sirve como control negativo, se prepara a partir de plasma humano negativo a progastrina diluido en tampón de bloqueo en las mismas diluciones que las muestras de ensayo, es decir, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10.

60 Después de completar la incubación con las muestras de plasma o suero, el contenido de los pocillos se retira y los pocillos se lavan tres veces con tampón de lavado, 100 µl/pocillo, después de lo cual la progastrina unida al primer anticuerpo se detecta utilizando un segundo anticuerpo específico para la progastrina, de la forma siguiente.

65 Se diluyen anticuerpos policlonales o monoclonales anti-progastrina acoplados a biotina específicos para la región amino-terminal de progastrina en tampón de bloqueo a una concentración de 0,1 a 10 µg/ml, dependiendo

del anticuerpo. A continuación se añaden 100 µl de la solución de anticuerpo a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a 22°C.

5 Después de completar la unión del anticuerpo secundario, las placas se lavan tres veces con tampón de lavado, 100 µl/pocillo, después de lo cual se añaden 100 µl de una solución de estreptavidina-HRP (25 ng/ml en tampón de bloqueo) a cada pocillo y se incuba 1 hora a 22°C. Después de completar la incubación con la solución de estreptavidina-HRP, las placas se lavan tres veces con tampón de lavado, 100 µl/pocillo. A continuación, se añaden a cada pocillo 100 µl de sustrato quimioluminiscente preparado utilizando un kit Pierce SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Chemiluminescent Substrate, se incuba durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad, y después se realiza la lectura en un luminómetro.

10 Sobre la base de las lecturas del luminómetro, se utiliza un análisis de regresión lineal para derivar la ecuación de las líneas correspondientes a los datos de la curva estándar. Utilizando esta ecuación se calcula a continuación la concentración de progastina en las diversas muestras de pacientes.

15 B. Resultados

Las gráficas de caja de la figura 4 muestran un percentil de 25, la mediana y un percentil de 75 de concentraciones de progastina en plasma sanguíneo en pacientes con cáncer de mama que tienen cáncer de mama metastásico en comparación con controles sanos. Los trazos indican percentiles de 5 y 95 de concentraciones de progastina en plasma sanguíneo. Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer de mama metastásico a los que se les habían extirpado tumores de cáncer de mama primarios tenían unas medianas superiores de concentraciones de progastina en plasma sanguíneo que las de individuos sanos. El análisis estadístico de los datos se presenta en la tabla 4.

25 En los tres pacientes a los que se había diagnosticado cáncer de mama primario sin metástasis se determinó que los niveles de progastina eran de 45,7 pM, 97,3 pM y 667,7 pM, lo que demuestra que los niveles de progastina eran también elevados en determinados pacientes con cáncer de mama primario.

Tabla 4	
Tabla analizada	Cáncer de mama
Columna A:	Controles
frente a	frente a
Columna D	T-M+
Ensayo de Mann Whitney	
Valor de P	< 0,0001
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana
Resumen del valor de P	***
¿Son las medianas signif. diferentes? (P < 0,05)	Sí
¿Valores de P de una cola o de dos colas?	Dos colas
Suma de rangos en la columna A,D	5900, 1976
U de Mann-Whitney	439,5

30 **Ejemplo 4: Efecto de anticuerpos policlonales anti-progastina sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 en cultivo**

35 Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos policlonales anti-progastina sobre el crecimiento de células MDA-MB-231 en cultivo.

A. Procedimientos

40 Se sembraron células MDA-MB-231 en placas de 6 pocillos (50.000 células/pocillo) en medio RPMI más el 10% de FBS, se incubaron durante un día y después se privaron de suero durante toda la noche. El medio se reemplazó después dos veces al día durante 48 horas por medio RPMI suplementado con el 0,5% de Pannexin H que contenía 2 µg/ml de un anticuerpo de control o un anticuerpo policlonal anti-progastina por triplicado. El anticuerpo de control era IgG anti-humana de conejo policlonal, Affinity BioReagents N° de ref. SA1-600, 2 µg/ml. El experimento se llevó a cabo por duplicado y el médico estaba cegado con respecto a los contenidos de las soluciones de tratamiento. Al concluir el experimento, se realizó un recuento por triplicado de las células de cada uno de los pocillos.

B. Resultados

Los resultados, mostrados en la figura 5, se calcularon como el número promedio de células por pocillo al final del experimento menos el número de células sembradas al comienzo del experimento. El análisis estadístico de los datos se presenta en la tabla 5. Los resultados de este experimento demuestran que los anticuerpos policlonales anti-progastrina son eficaces para reducir el crecimiento de células del cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 *in vitro*, en comparación con anticuerpos policlonales de control.

Tabla 5	
Tabla analizada	MDA-MB-231
Columna D	PAb anti-PG-T0
frente a	frente a
Columna E	PAb CT-T0
Ensayo de Mann Whitney	
Valor de P	0.0139
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana
Resumen del valor de P	*
¿Son las medianas signif. diferentes? (P < 0,05)	Sí
¿Valores de P de una cola o de dos colas?	Una cola
Suma de rangos en la columna D,E	481, 695
U de Mann-Whitney	181,0

10 **Ejemplo 5: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 en cultivo**

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células MDA-MB-231 en cultivo.

15

A. Procedimientos

En un primer experimento utilizando MAb3 y MAb8, se sembraron células MDA-MB-231 en placas de 6 pocillos (50.000-150.000 células/pocillo) en medio RPMI más el 10% de FBS, se incubaron durante ocho horas y después se privaron de suero durante toda la noche. Partiendo 24 horas después de la siembra (tiempo "T0"), el medio se reemplazó dos veces al día durante 48 horas por medio RPMI suplementado con el 0,5% de Pannexin H que contenía 1-10 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-hPG o un anticuerpo monoclonal de control (IgG1 anti-humana de ratón). En T0 se realizó un recuento del número de células en tres pocillos por cada experimento. Cuarenta y ocho horas después, se realizó un recuento por cuadruplicado del número de células supervivientes en cada uno de los pocillos en forma cegada. Los recuentos de células en T0 se sustrajeron de los recuentos de células a 48 horas y los datos se normalizaron como porcentaje con respecto al número de células supervivientes al tratamiento con anticuerpo de control.

En un segundo experimento, se sembraron células MDA-MB-231 en placas de 6 pocillos (100.000 células/pocillo) y se trataron con MAb8, MAb13, MAb16 y MAb19 (10 µg/ml) como anteriormente.

30

B. Resultados

Los resultados de los experimentos, mostrados en la figura 6 y la figura 7, demuestran que cinco anticuerpos anti-hPG diferentes, MAb3, MAb8, MAb13, MAb16 y MAb19 son eficaces para inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MDA-MB-231 *in vitro* en comparación con anticuerpos monoclonales de control. El efecto inhibitorio de MAb8 era sensible a la dosis. MAb8 y MAb13 reconocen epítopos C-terminales de hPG, mientras que MAb3, MAb 16 y MAb19 reconocen cada uno epítopos N-terminales, lo que demuestra que la actividad neutralizante de anticuerpos no depende de si el epítipo diana está ubicado en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de la proteína de progastrina.

35

40

Ejemplo 6: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MCF-7 en cultivo

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células MCF-7 en cultivo.

45

A. Procedimientos

Se sembraron células MCF-7 en placas de 6 pocillos (100.000 células/pocillo) y se cultivaron en DMEM que

50

5 contenía el 10% de suero de carnero fetal durante 8 horas. Las células se privaron de suero durante toda la noche, y partiendo 24 horas después de la siembra (tiempo T0), las células se trataron cada 12 horas durante 48 horas, en presencia del 0,5 % de PanexinH, con 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal de control (IgG1 antihumana de ratón, Calbiochem, N° de ref. 411451) o con 1 µg/ml de MAb3 anti-hPG como se indica. A las 48 horas se realizó un recuento del número de células vivas en las células tratadas tanto con MAb de control como con Mab anti-hPG. Los recuentos de células al comienzo del tratamiento (T0) se sustrajeron de los recuentos de células de ensayo y de control medidos a las 48 horas. El médico estaba cegado con respecto a los contenidos de las soluciones de tratamiento.

10 B. Resultados

15 Los resultados, mostrados en la figura 8, se calcularon como el número promedio de células por pocillo al final del experimento menos el número de células sembradas al comienzo del experimento. El análisis estadístico de los datos se presenta en la tabla 6. Los resultados de este experimento demuestran que los anticuerpos monoclonales anti-progastrina son eficaces para reducir el crecimiento de células del cáncer de mama metastásico MCF-7 *in vitro*, en comparación con anticuerpos de control.

Tabla 6	
Tabla analizada	MCF-7
Columna D	MAb3 anti-PG-T0
frente a	frente a
Columna E	MAb CT-T0
Ensayo de Mann Whitney	
Valor de P	0,0194
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana
Resumen del valor de P	*
¿Son las medianas signif. diferentes? (P < 0,05)	Sí
¿Valores de P de una cola o de dos colas?	Dos colas
Suma de rangos en la columna D,E	109, 191
U de Mann-Whitney	31,00

20 **Ejemplo 7: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico T47D en cultivo**

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales anti-PG sobre el crecimiento de células T47D en cultivo.

25 A. Procedimientos

30 Se sembraron células T47D en placas de 6 pocillos (50.000 células/pocillo) y se cultivaron en RPMI que contenía el 10% de suero de carnero fetal durante 8 horas. Las células se privaron de suero durante toda la noche, y partiendo 24 horas después de la siembra (tiempo T0), las células se trataron cada 12 horas durante 48 horas, en presencia del 0,5 % de PanexinH, con 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal de control (IgG1 antihumana de ratón, Calbiochem N° de ref. 411451) o con 1 µg/ml de MAb3 anti-hPG como se indica. A las 48 horas se realizó un recuento del número de células vivas en células tratadas tanto con MAb de control como con Mab anti-hPG. Los recuentos de células al comienzo del tratamiento (T0) se sustrajeron de los recuentos de células de ensayo y de control medidos a las 48 horas. El médico estaba cegado con respecto a los contenidos de las soluciones de tratamiento.

35 B. Resultados

40 Los resultados, mostrados en la figura 9, se calcularon como el número promedio de células por pocillo al final del experimento menos el número de células sembradas al comienzo del experimento. El análisis estadístico de los datos se presenta en la tabla 7. En este experimento no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en el efecto sobre el crecimiento de células T47D *in vitro* mediante el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-progastrina MAb3 en comparación con anticuerpos de control.

Tabla 7	
Tabla analizada	T47D
Columna D	MAb CT-T0
frente a	frente a

Tabla 7	
Tabla analizada	T47D
Columna E	MAB anti-PG-T0
Ensayo de Mann Whitney	
Valor de P	0,1248
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana
Resumen del valor de P	ns
¿Son las medianas signif. diferentes? (P < 0,05)	No
¿Valores de P de una cola o de dos colas?	Una cola
Suma de rangos en la columna D,E	108,5, 144,5
U de Mann-Whitney	42,50

Ejemplo 8: Efecto de condiciones de cultivo de baja adherencia sobre la expresión del gen de la gastrina en estirpes celulares de cáncer de mama metastásico

- 5 Este ejemplo compara el efecto sobre la expresión del gen de la gastrina en estirpes celulares MDA-MB-231 y MCF7 de cultivo en condiciones de cultivo tisular convenciones y condiciones de baja adherencia.

A. Procedimientos

- 10 Las células MDA-MB-231 y MCF-7 se cultivaron en condiciones de cultivo convencionales y de baja adherencia. Al comienzo del experimento, se cultivaron 30.000 células en matraces de 75 cm² convencionales y con adherencia ultrabaja (Corning) en medio MammoCult (StemCell #05621) con suplemento de proliferación MammoCult (StemCell # 05622), 5 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin. Después de su recogida, las células se disociaron en Accumax (Sigma) durante 45 minutos a 37°C antes de la extracción de ARN, después de lo cual se extrajo ARN total según técnicas estándar. El ARNm de la gastrina se cuantificó utilizando RT-PCR cuantitativa. Los datos se expresan en comparación con niveles de ARNm de gastrina determinados en células MDA-MB-435, que expresan el gen de la gastrina a niveles ligeramente superiores al umbral de detección.

20 B. Resultados

- Los resultados se muestran en la figura 10. En células MDA-MB-231, el cultivo en condiciones de cultivo de baja adherencia aumenta la cantidad de ARNm de gastrina en dichas células en comparación con el cultivo en condiciones de cultivo tisular convencionales. En células MCF7, la expresión del gen de la gastrina se redujo en células cultivadas en condiciones de baja adherencia en comparación con el mismo tipo de células cultivadas en condiciones convencionales.

Ejemplo 9: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

- 30 Este ejemplo describe el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento como esferoides de la línea celular de cáncer de mama metastásico MCF-7 cuando se cultivaron dichas células en condiciones de cultivo de baja adherencia.

35 A. Procedimientos

- Se sembraron células MCF-7 en placas de cultivo de baja adherencia (500 células/pocillo) en 500 µl de medio MammoCult carente de suero. Cada día durante 10 días después del plaqueo se añadieron anticuerpos monoclonales anti-hPG (MAB8) o anticuerpos monoclonales de control al medio de cultivo dos veces al día (3 µg/ml). Al final del experimento se realizó un recuento del número de esferoides que se formaron en presencia de los anticuerpos anti-hPG y los anticuerpos de control. El experimento se llevó a cabo en forma cegada.

B. Resultados

- 45 Los resultados se muestran en la figura 11, que demuestra que el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico MCF-7 como esferoides en cultivo de baja adherencia se reduce mediante el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-hPG MAB8 en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control no específico.

Ejemplo 10: Efecto del pretratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer de mama metastásico como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

5 Este ejemplo describe el efecto del pretratamiento utilizando un anticuerpo monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento como esferoides de la línea celular de cáncer de mama metastásico MCF-7 cuando se cultiva en condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. Procedimientos

10 Las células se cultivaron en primer lugar en cultivo adherente convencional durante 48 horas en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-hPG (MAb3) o un anticuerpo monoclonal de control. Al final del tratamiento se plaquearon 500 células/pocillo en placas de 24 pocillos de baja adherencia en 500 µl de medio Mammocult carente de suero y se cultivaron durante 11 días sin tratamiento adicional con anticuerpos. Al final del experimento se realizó el recuento del número de esferas por pocillo.

B. Resultados

20 Los resultados se muestran en la figura 12, que demuestra que el pretratamiento de células de cáncer de mama metastásico MCF-7 con el anticuerpo monoclonal anti-hPG MAb3 fue eficaz para reducir el número de esferoides formados por dichas células cuando se cultivaron más tarde en condiciones de baja adherencia sin tratamiento adicional con anticuerpos. Debido a que el cultivo en condiciones de baja adherencia se selecciona para el crecimiento de células madre del cáncer de mama, estos resultados indican que los anticuerpos neutralizantes anti-PG son eficaces para reducir el número de dichas células madre en una población de células de cáncer de mama. Además, la observación de que este pretratamiento con los anticuerpos específicos reduce eficazmente el número de células madre del cáncer de mama sugiere que la exposición de tumores de mama a anticuerpos neutralizantes anti-PG puede tener efectos duraderos sobre la reducción de la tumorigenicidad de las células madre incluso una vez que los anticuerpos ya no están presentes.

Ejemplo 11: Cuantificación de niveles de PG en plasma o suero

Los niveles de PG en plasma y/o suero pueden determinarse de forma cómoda utilizando el ensayo siguiente. Se recubren placas de microvaloración de 96 pocillos con entre 0,5 y 10 µg/ml de un anticuerpo anti-hPG C-terminal, por ejemplo un anticuerpo policlonal anti-hPG C-terminal de conejo, o un anticuerpo anti-hPG C-terminal descrito en la presente memoria, y después se incuban durante toda la noche. Las placas se lavan después tres veces en PBS-Tween (0,05%) y se bloquean con leche en polvo no grasa al 2% (p/v) en PBS-Tween (0,05%). Por separado, se preparan muestras de ensayo, muestras de control (muestras en blanco o negativas a PG en suero o plasma), y entre aproximadamente 5 pM ($0,5 \times 10^{-11}$ M) y aproximadamente 0,1 nM (1×10^{-10} M) de un patrón de referencia de hPG (hPG liofilizada diluida en plasma o suero negativo a PG) en un diluyente apropiado (por ejemplo, PBS-Tween al 0,05%). Las muestras se incuban en las placas recubiertas entre 2 y 4 horas a 37°C, o como alternativa entre 12 y 16 horas a 21°C. Después de la incubación, las placas se lavan tres veces con PBS-Tween (0,05%) y se incuban con entre 0,001 y 0,1 µg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal, por ejemplo un anticuerpo anti-hPG N-terminal policlonal o un anticuerpo anti-hPG N-terminal monoclonal tal como se describe en la presente memoria, se acoplan a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Nakane *et al.*, 1974, J. Histochem. Cytochem. 22(12):1084-1091) durante 30 minutos a 21°C. Las placas se lavan después tres veces en PBS-Tween (0,05%) y se añade sustrato HRP durante 15 minutos a 21°C. La reacción se detiene mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 M y se lleva a cabo una medición de la densidad óptica a 405 nm. Los niveles de hPG en la muestra se determinan mediante comparación con una curva estándar construida a partir de las mediciones derivadas del patrón de referencia de hPG.

Ejemplo 12: Ensayo ELISA para evaluar la especificidad de anticuerpos anti-hPG

La especificidad de anticuerpos anti-hPG puede determinarse de forma cómoda utilizando un ensayo ELISA de la forma siguiente. Se incuban placas de 96 pocillos durante toda la noche a 4°C con una concentración o unas concentraciones apropiadas de polipéptido de ensayo (por ejemplo, 25 y 50 ng de PG humana recombinante y 50 y 250 ng de CTFP u otros productos génicos derivados de gastrina) en solución salina tamponada con sulfatos (PBS), después de lo cual los pocillos se lavan tres veces con solución de lavado (PBS y el 0,1% de Tween-20), y después se incuban durante 2 horas a 22°C con 100 µl de solución de bloqueo (PBS, el 0,1% de Tween-20, 0,1% de seroalbúmina bovina o hidrolizado de caseína) por pocillo. Después del bloqueo, los pocillos se lavan tres veces y se añade el anticuerpo que se va a analizar (anticuerpo de ensayo). Se añaden a cada pocillo 100 µl del anticuerpo de ensayo (en 0,3 a 1 ng/ml) en PBS y el 0,1% de Tween-20. Después las placas se incuban durante 2 horas a 22°C, después de lo cual la solución de anticuerpo de ensayo se descarta y se reemplaza, después de una etapa de lavado (3 X 100 µl, solución de lavado, como se ha indicado anteriormente), por solución de bloqueo que contiene un anticuerpo secundario, un anticuerpo de IgG (Fc) antirratón de cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante. Después de una incubación de 1 hora con anticuerpo secundario, se añaden a cada pocillo 100 µl de solución de sustrato (por ejemplo, Fast OPD o

diclorhidrato de O-fenilendiamina, disponible de Sigma-Aldrich Co., preparada según las instrucciones del fabricante) y se incuban en la oscuridad durante 20 minutos a 22°C. La reacción se detiene añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 4 N y la cantidad de sustrato catalizado se determina mediante medición de la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. La conversión de sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario (de ensayo) unido al antígeno. Los experimentos se llevan a cabo por duplicado y las mediciones de la DO se representan como función de la concentración de antígeno. Los anticuerpos se clasifican como específicos para hPG si la D.O. medida se encuentra entre 0,2 y 1,5 para hPG y no existe ninguna señal estadísticamente significativa superior al fondo con CTFP o cualquiera de los otros péptidos derivados de genes de gastrina, siendo el fondo la señal promedio de los pocillos de control que contienen solo PBS.

Ejemplo 13: Ensayo para evaluar la actividad neutralizante de anticuerpos anti-hPG

Se puede realizar un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo anti-hPG específico es neutralizante de la forma siguiente. Se siembran células de cáncer de mama en una placa de 6 pocillos, a aproximadamente de 50.000 a 100.000 células por pocillo. Las células se tratan después a intervalos de 12 horas durante 48 horas con el anticuerpo anti-hPG de ensayo o un anticuerpo de control, a concentraciones del anticuerpo de aproximadamente 10 µg/ml. Un anticuerpo de ensayo se define como neutralizante en el ensayo si el número de células tratadas con el anticuerpo de ensayo muestra una reducción estadísticamente significativa de por lo menos el 10% en el número de células supervivientes en comparación con el número de células tratadas con un anticuerpo no específico de control, utilizando un ensayo de Mann-Whitney de dos colas (con diferencias consideradas como significativas cuando $p < 0,05$). El número de células totales se corrigió en función del número de células al comienzo del periodo de tratamiento, denominado T0. Las células del cáncer de mama ejemplificativas para su utilización en este ensayo incluyen, pero sin limitación, células MDA-MB-231 y células MCF7.

Ejemplo 14: Ensayo para evaluar la afinidad de un anticuerpo anti-hPG

Pueden medirse las constantes de afinidad de anticuerpos anti-hPG utilizando la técnica de proteón (BioRad), según Nahshol *et al.*, 2008, Analytical Biochemistry 383:52-60, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. En síntesis, para anticuerpos anti-PG murinos, se recubre en primer lugar un chip sensor con un anticuerpo de IgG antirratón (50 µg/ml), asegurándose que la señal detectada por el chip después de la inyección del anticuerpo se encuentra entre 10.000 y 11.500 unidades de respuesta (RU). El anticuerpo anti-hPG murino de interés (anticuerpo de ensayo) se inyecta a continuación (a una concentración típica de 30 µg/ml). Si el anticuerpo de ensayo se une suficientemente se observará una señal adicional de por lo menos 500 RU. Se obtiene después un desarrollo del transcurso de la unión con respecto al tiempo entre el anticuerpo de ensayo y hPG inyectando concentraciones variables de hPG, por ejemplo 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM y 12,5 nM, y detectando el nivel de asociación. Normalmente, hay disponibilidad de una diversidad de canales para analizar múltiples anticuerpos en paralelo en un único experimento, lo que posibilita analizar la unión de un anticuerpo de ensayo individual a diferentes concentraciones de hPG en paralelo. A un canal debería inyectarse un anticuerpo monoclonal murino que no sea específico de hPG como control para la unión no específica y a otro canal debería inyectarse tampón de dilución solo como referencia para la señal de fondo. En general, no se detecta ninguna unión en el canal al que se ha inyectado anticuerpo murino no específico. Los anticuerpos que muestran un nivel alto de asociación en este marco, que puede dar como resultado la saturación del anticuerpo monoclonal atrapado por hPG, pueden analizarse frente a concentraciones de hPG más reducidas (50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM y 3,125 nM), lo que permite una medición más refinada.

Las constantes de afinidad (KD) se calculan como la relación entre la constante de disociación (kd) y la constante de asociación (ka). Los valores experimentales pueden validarse analizando la similitud estadísticamente relevante entre curvas experimentales basadas en mediciones de unión y perfiles teóricos.

Las constantes de afinidad de anticuerpos anti-hPG no murinos pueden evaluarse en un formato similar utilizando una IgG específica para las especies de origen del anticuerpo de ensayo anti-hPG.

Ejemplo 15: Ensayo para evaluar la unión competitiva con un anticuerpo anti-hPG de referencia

Puede realizarse un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo de interés (anticuerpo de ensayo) compite por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado de la forma siguiente. Se recubren placas de 96 pocillos con un anticuerpo anti-hPG de captura (anticuerpo policlonal o monoclonal que reconoce una región N-terminal o C-terminal de hPG que difiere del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), a una concentración que se elegirá dentro del intervalo de 1-10 µg/ml, durante toda la noche a 4°C (0,1 a 1 µg/pocillo). Después del bloqueo con un tampón de bloqueo (0,1% de Tween-20, 0,1% de BSA en PBS) durante 2 h a 22°C, se añade hPG recombinante a una concentración que varía entre 10 pM y 1 nM (10 y 1000 pg/pocillo) y se incuba durante 2 h a 22°C. A continuación se añade el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado (o una mezcla que contiene el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), junto con concentraciones crecientes de anticuerpo de ensayo sin marcar, y se incuba durante 1 h a 22°C. Después de lavar para eliminar los anticuerpos no unidos, se realiza la detección del anticuerpo anti-hPG de referencia

marcado unido incubando la mezcla con 50 ng/ml de estreptavidina-HRP durante 1 h a 22°C, operación seguida por incubación con un sustrato fluorógeno para la peroxidasa de rábano picante y después se cuantifican las unidades relativas de luz (RLU) en un luminómetro. Los ensayos se realizan por duplicado.

5 Los anticuerpos que compiten con un anticuerpo anti-hPG de referencia inhiben la unión del anticuerpo de referencia a hPG. Un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítipo, o a un epítipo solapado, que el anticuerpo de referencia reduce significativamente (por ejemplo, en por lo menos el 50%) la cantidad de anticuerpo anti-hPG de referencia unido, como se evidencia mediante la reducción observada de las RLU.

10 Se obtiene un valor de control elevado a partir de un experimento de control llevado a cabo mediante incubación del anticuerpo de referencia marcado con hPG recombinante sin anticuerpo de ensayo. Un valor de control reducido se obtiene a partir de un experimento de control llevado a cabo mediante incubación del anticuerpo de referencia marcado con hPG recombinante en presencia de concentraciones en exceso del anticuerpo de referencia sin marcar (el anticuerpo de referencia sin marcar compite de esta forma con el anticuerpo marcado por la unión a hPG). La capacidad de los anticuerpos de ensayo para competir con el anticuerpo anti-hPG de referencia se determina después mediante incubación del anticuerpo de referencia marcado con hPG recombinante en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo de ensayo sin marcar.

20 En un ensayo de prueba, una reducción significativa en las RLU observadas en presencia del anticuerpo de ensayo indica que el anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo anti-hPG de referencia.

25 La inhibición de la unión puede expresarse como una constante de inhibición, o K_i , que se calcula según la fórmula siguiente:

$$K_i = CI_{50} / (1 + ([\text{concentración de Ab anti-hPG de referencia}] / K_D^{\text{Ab anti-hPG de referencia}}))$$

30 en la que " CI_{50} " es la concentración del anticuerpo de ensayo que proporciona una reducción del 50% en la unión del anticuerpo de referencia y $K_D^{\text{Ab anti-hPG de referencia}}$ es la constante de disociación del anticuerpo anti-hPG de referencia, una medida de su afinidad por hPG. Los anticuerpos de ensayo útiles que compiten con un anticuerpo anti-hPG de referencia (por ejemplo, uno de los anticuerpos anti-hPG descritos en la presente memoria) tendrán típicamente K_i que varían de 10 pM a 100 nM en las condiciones de ensayo que se describen en la presente memoria.

35 **Listado de secuencias**

<110> Biorealities S.A.S. et al.

<120> Procedimientos para tratar el cáncer de mama

40 <130> N.112751

<150> 61/293,612

<151> 2010-01-08

45 <160> 106

<170> PatentIn versión 3.5

50 <210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

55 <220>

<223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp

1

5

60 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

65

<220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2
 Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser
 5 1 5

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 3
 Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr
 1 5

<210> 4
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 4
 Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 30 1 5 10

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 5
 Lys Val Ser
 40 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 6
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 55 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 7

ES 2 657 245 T3

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp
1 5

<210> 8
<211> 8
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <400> 8
Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 9
<211> 11
15 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
20 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 9
Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

25 <210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 10
Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr
1 5 10

35 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial

40 <220>
<223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
45 1 5

<210> 12
<211> 115
<212> PRT
50 <213> secuencia artificial

<220>
<223> descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

55 <400> 12

ES 2 657 245 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

- 5 <210> 13
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 13
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

- 15 <210> 14
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 245 T3

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

5

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

15

<400> 15

Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Val Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16

20 <211> 345

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

10

<400> 16

gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac 96
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att 144
 Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp ile
 35 40 45

ggc ggt ttt tat cct gga aat agt gat tct agg tac aac cag aaa ttc 192
 Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

aag ggc aag gcc aca ctg act gca gtc aca tcc gcc agt act gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gac ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

aca aga aga gat agt ccc cag tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca 336
 Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110

gtc tcc tca 345
 Val Ser Ser
 115

<210> 17

15

<211> 336

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

20

<223> descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

25

<222> (1)..(336)

<400> 17

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat agt 96
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

ES 2 657 245 T3

		<p>gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80</p>	
		<p>agc aga ctg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt. 288 Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly 85 90 95</p>	
		<p>tca cat gtt ccg ttc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110</p>	
		<p><210> 18 <211> 354 <212> DNA <213> secuencia artificial</p>	
5			
		<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético</p>	
10			
		<p><220> <221> CDS <222> (1)..(354)</p>	
15			
		<p><400> 18 cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc 48 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15</p>	
		<p>tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc 96 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser 20 25 30</p>	
		<p>tgg ata gag tgg tta aaa cag agg cct gga cat ggc ctt gag tgg att 144 Trp Ile Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45</p>	
		<p>gga gag ttt tta cct gga agt ggt agt aca gac tac aat gag aag ttc 192 Gly Glu Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe 50 55 60</p>	
		<p>aag ggc aag gcc aca ttc act gca gac aca tcc tcc gac aca gcc tac 240 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr 65 70 75 80</p>	
		<p>atg cta ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt 288 Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95</p>	
		<p>gca act gat ggt aat tat gac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336 Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110</p>	
		<p>ctg gtc act gtc tct gca 354 Leu Val Thr Val Ser Ala 115</p>	
		<p><210> 19 <211> 336 <212> DNA <213> secuencia artificial</p>	
20			
		<p><220> <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético</p>	
25			
		<p><220> <221> CDS <222> (1)..(336)</p>	
30		<p><400> 19</p>	

ES 2 657 245 T3

gat ctt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
 Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt 96
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

agt gga gtc acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Ser Gly Val Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

aca cat gtt cct ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa 336
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 20
 <211> 80
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Asn Arg Asp Leu Glu Leu Pro Trp Leu Glu Gln Gln Gly Pro Ala
 20 25 30

Ser His His Arg Arg Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val
 35 40 45

Ala Asp Pro Ser Lys Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu
 50 55 60

Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 65 70 75 80

10 <210> 21
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 21

ES 2 657 245 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 112
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 22
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 245 T3

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 24
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Ser Gly Val Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

- 20 <210> 25
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <900> 25

ES 2 657 245 T3

Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5 10

<210> 26
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es un residuo modificado ácido aminohexanoico

15 <400> 26
 Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Xaa Cys
 1 5 10 15

20 <210> 27
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <900> 27
 Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
 1 5 10 15

25 Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 20 25

<210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 28
 Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5

35 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 29
 Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5

45 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
 1 5

50 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 31
 Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
 1 5

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 32
 Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 33
 Phe Gly Arg Arg
 1
 15
 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 34
 Met Asp Phe Gly Arg
 1 5
 25
 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 35
 Ala Glu Asp Glu Asn
 1 5
 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 36
 Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg
 1 5
 40
 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 37
 Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala
 1 5
 50
 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 38
 Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5
 60

<210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 10 <400> 39
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
 1 5

 <210> 40
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 20 <400> 40
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala
 1 5

 <210> 41
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 30 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 41
 Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
 1 5

 35 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 42
 Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr
 1 5

 45 <210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 50 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 43
 Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr
 55 1 5

 <210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 60 <213> secuencia artificial

 <220>

<223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44
 Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr
 1 5

5 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 45
 Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe
 1 5 10

15 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 46
 Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr
 1 5

30 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 47
 Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 48
 Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr
 1 5 10

50 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 49
 Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe
 1 5 10

60 <210> 50

<211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 50
 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
 1 5 10

10 <210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 51
 Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
 1 5

20 <210> 52
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 52
 Gln Met Ser
 1

<210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 53
 Leu Val Ser
 1

45 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 54
 Val Lys Lys Asp Gly Ser His
 1 5

55 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

60 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 55
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

5 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 56
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr
 1 5

15 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 57
 Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr
 1 5

25 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 58
 Gly Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val
 1 5 10

35 <210> 59
 <211> 117
 <212> PRT
 40 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

45 <400> 59
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr

ES 2 657 245 T3

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 60

<211> 114

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Arg Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 61

15 <211> 117

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 61

ES 2 657 245 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 62

<211> 121

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 62

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 63

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20

ES 2 657 245 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5 <400> 63
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 64

<211> 112

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

15 <400> 64
 Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

20 <210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 245 T3

<400> 65

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 66

5 <211> 115

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 66

Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
35 40 45

Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65 70 75 80

Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Thr Val Leu
115

15 <210> 67

<211> 351

<212> DNA

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

ES 2 657 245 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

5

<400> 67
 qaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc act acc tat 96
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 gcc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca acc att agt agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggt cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac gcc cta tac 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg agc agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aca cag ggg aat tac tct ttg gac ttc tgg ggc caa ggc acc tct 336
 Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 ctc aca gtc tcc tca 351
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 68
 <211> 342
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

20

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(342)

<400> 68

ES 2 657 245 T3

	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct gga ggg Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15	48
	tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt agc tat Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr 20 25 30	96
	ggc atg tct tgg gtt cgc cag tct cca gac agg agg ctg gag ttg gtc Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Arg Arg Leu Glu Leu Val 35 40 45	144
	gca agt att aat act ttt ggt gat aga acc tat tat cca gac agt gtg Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60	192
	aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80	240
	ctg caa atg acc agt ctg aag tct gag gac aca gcc att tat tac tgt Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
	gca aga ggg acc gga acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val 100 105 110	336
	tcc tca Ser Ser	342
	<210> 69 <211> 351 <212> DNA <213> secuencia artificial	
5	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético	
10	<220> <221> CDS <222> (1)..(351)	
15	<400> 69 cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
	tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30	96
	tat atg tac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45	144
	gga gag att aat cct agc aat ggt ggt act aac ttc aat gag aag ttc Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe 50 55 60	192
	aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gca tac Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
	atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
	aca aga ggc ggt tac tac ccc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr 100 105 110	336
	ctc aca gtc tcc tca Leu Thr Val Ser Ser 115	351

ES 2 657 245 T3

<210> 70
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
 <220>
 10 <221> CDS
 <222> (1)..(363)
 <400> 70
 gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct tct cag 48
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 tct ctg tcc ctc aca tgc act gtc act ggc tac tca atc acc agt gat 96
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 15 tat gcc tgg aat tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag tgg 144
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 atg ggc tac ata agc ttc agt ggt tac act agt tac aac cca tct ctc 192
 Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 aaa agt cga atc tct gtc act cgg gac aca tcc agg aac caa ttc ttc 240
 Lys Ser Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 ctc cag ttg act tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt 288
 Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga gag gtc aac tat ggg gac tcc tac cac ttt gac tac tgg ggc 336
 Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 caa ggc acc att gtc aca gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 71
 <211> 336
 20 <212> DNA
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 30 <400> 71

ES 2 657 245 T3

```

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1           5           10           15

aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act      96
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
          20           25           30

aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct      144
Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45

cct caq ctc ctg att tat cag atg tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca      192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
          50           55           60

gac agg ttc agt agc agt ggg tca gga act gat ttc aca ctg aga atc      240
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65           70           75           80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
          85           90           95

cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa      336
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
          100           105           110

```

<210> 72

<211> 336

5 <212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

15 <400> 72

```

gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att gga      48
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1           5           10           15

caa cca gcc tcc atc tcc tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt      96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
          20           25           30

gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct      144
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35           40           45

cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga gtc cct      192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
          50           55           60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc      240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
          85           90           95

aca cat ttt cct cag acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa      336
Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100           105           110

```

<210> 73

<211> 336

20 <212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

ES 2 657 245 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

5

<400> 73

gat gtt gtg atg acc cag act cca ctg act ttg tgg gtt acc att ggg 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

cgc cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta gac agt 96
 Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

gat gga aag aca tat ttg tat tgg ttg tta cag agg cca gcc cag tct 144
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct gag ctg gac tct gga gtc cct 192
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg atc act ggc agt ggg tgg ggg aca gat ttc aca ctg aag atc 240
 Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa gga 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

aca cat tct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336
 Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

10

<210> 74

<211> 345

<212> DNA

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 74

ES 2 657 245 T3

```

caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc      48
Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1          5          10          15

tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc      96
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
          20          25          30

att gaa tgg tat cag caa cag tca ctc aag cct cct aag tat gtg atg      144
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
          35          40          45

gag gtt aag aaa gat gga agc cac agc aca ggt cat ggg att cct gat      192
Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp
          50          55          60

cgc ttc tct gga tcc agt tct ggt gct gat cgc tac ctc agc att tcc      240
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65          70          75          80

aac atc cag cct gaa gat gaa gca ata fac atc tgt ggt gtg ggt gat      288
Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
          85          90          95

gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc      336
Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
          100          105          110

act gtc cta
Thr Val Leu
          115

```

5 <210> 75
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

```

<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
          20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
          100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
          115

```

15 <210> 76
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

ES 2 657 245 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<400> 76

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1          5          10          15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
          20          25          30
Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
          85          90          95
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```

10

<210> 77

<211> 117

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 77

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
          20          25          30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
          100          105          110
Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

20

<210> 78

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 657 245 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<400> 78

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
 20 25 30
 Lys Gly Ile Thr Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10

<210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 79

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

20

<210> 80

<211> 114

<212> PRT

ES 2 657 245 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 81

10

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 81

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

20

<210> 82

ES 2 657 245 T3

<211> 114
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 82
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

10 <210> 83
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 83
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

ES 2 657 245 T3

<210> 84
 <211> 117
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10 <400> 84
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 85
 <211> 112
 15 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

20 <400> 85

ES 2 657 245 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 86

<211> 117

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 86

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 87

ES 2 657 245 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Glr Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88

<211> 117

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 89

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 89

ES 2 657 245 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 90

<211> 121

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 90

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 91

15 <211> 115

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 245 T3

<400> 91

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45

Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

5

<210> 92

<211> 121

<212> PRT

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 92

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 93

<211> 115

<212> PRT

ES 2 657 245 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<400> 93

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45

Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

10

<210> 94

<211> 121

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 94

ES 2 657 245 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 115
5 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10 <400> 95
Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45

Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 96
<211> 29
15 <212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa is un residuo modificado ácido aminohexanoico

<400> 96
 Cys Xaa Xaa Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly
 1 5 10 15

Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 20 25

10 <210> 97
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa es un residuo modificado ácido aminohexanoico

<400> 97
 Cys Xaa Xaa Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
 25 1 5 10

<210> 98
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(12)
 <223> Xaa es un residuo modificado ácido aminohexanoico

40 <400> 98
 Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn Xaa Xaa Cys
 1 5 10

<210> 99
 <211> 15
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 99
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

55 <210> 100
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 100

ES 2 657 245 T3

Met Gln Arg Leu Cys Val Tyr Val Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ala Phe Ser Glu Ala Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala
20 25 30

Pro Leu Gly Thr Gly Ala Asn Arg Asp Leu Glu Leu Pro Trp Leu Glu
35 40 45

Gln Gln Gly Pro Ala Ser His His Arg Arg Gln Leu Gly Pro Gln Gly
50 55 60

Pro Pro His Leu Val Ala Asp Pro Ser Lys Lys Gln Gly Pro Trp Leu
65 70 75 80

Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser
85 90 95

Ala Glu Asp Glu Asn
100

- 5 <210> 101
- <211> 80
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- 10 <400> 101
- Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly
1 5 10 15

Ala Asn Arg Asp Leu Glu Leu Pro Trp Leu Glu Gln Gln Gly Pro Ala
20 25 30

Ser His His Arg Arg Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val
35 40 45

Ala Asp Pro Ser Lys Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu
50 55 60

Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
65 70 75 80

- 15 <210> 102
- <211> 34
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 102
- Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val Ala Asp Pro Ser Lys
1 5 10 15

Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met
20 25 30

- 20 Asp Phe
- <210> 103
- <211> 35
- <212> PRT
- <213> Homo Sapiens

- 25 <400> 103

ES 2 657 245 T3

Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val Ala Asp Pro Ser Lys
1 5 10 15

Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met
20 25 30

Asp Phe Gly
35

<210> 104

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15

Phe

10

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 105

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
1 5 10 15

Phe Gly

20

<210> 106

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

25

Ser Ala Glu Asp Glu Asn
1 5

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la progastrina humana para la utilización en la prevención o la prevención de la recurrencia o el tratamiento de cáncer de mama sensible a progastrina, en la que dicho anticuerpo comprende:
- una región variable de cadena pesada en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 1, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 2, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 3, y una región variable de cadena ligera en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 4, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 5 y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 6; o
 - una región variable de cadena pesada en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 37, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 41, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 45, y una región variable de cadena ligera en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 49, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 52, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 55; o
 - una región variable de cadena pesada en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 38, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 42, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 46, y una región variable de cadena ligera en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 50, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 53, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 56; o
 - una región variable de cadena pesada en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 39, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 43, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 47, y una región variable de cadena ligera en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 50, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 53, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 57; o
 - una región variable de cadena pesada en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 40, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 44, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 48, y una región variable de cadena ligera en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 51, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 54, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 58.
2. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-progastrina humana se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos camelizados, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.
3. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está conjugado a una fracción.
4. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo presenta una afinidad de unión a progastrina comprendida entre 10^{-6} M y 10^{-12} M.
5. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo comprende:
- una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 12, y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 13; o
 - una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 59, y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 63; o
 - una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 60, y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 64; o
 - una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 61, y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 65; o
 - una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 61, y una región variable de cadena ligera

de secuencia SEC ID nº: 66.

6. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es quimérico.
- 5 7. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está humanizado.
8. Composición para la utilización según la reivindicación 7, en la que dicho anticuerpo comprende:
- 10 • una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 21, y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 22; o
 - 15 • una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 75, SEC ID nº: 77, y SEC ID nº: 79, y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 76 y SEC ID nº: 78; o
 - 20 • una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 80 y SEC ID nº: 82, y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 81 y SEC ID nº: 83; o
 - 25 • una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 84, SEC ID nº: 86, y SEC ID nº: 88, y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 85, SEC ID nº: 87, y SEC ID nº: 89; o
 - una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 90, SEC ID nº: 92, y SEC ID nº: 94, y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 91, SEC ID nº: 93, y SEC ID nº: 95.
9. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el cáncer de mama sensible a la progastrina es un cáncer de mama primario o un cáncer de mama metastásico.
- 30 10. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición de anticuerpo anti-progastrina humana se administra antes de o tras la resección quirúrgica de un tumor de mama.
- 35 11. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición de anticuerpo anti-progastrina humana se administra antes de o tras la administración de una dosis de radioterapia para el cáncer de mama.
- 40 12. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición de anticuerpo anti-progastrina humana se administra antes de, concurrentemente a o tras la administración de un agente quimioterápico para tratar el cáncer de mama.
- 45 13. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición de anticuerpo anti-progastrina humana se administra antes de, concurrentemente a o tras la administración de un agente de hormonoterapia para tratar el cáncer de mama.
- 50 14. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición de anticuerpo anti-progastrina humana se administra antes de, concurrentemente a o tras la administración de un segundo anticuerpo terapéutico con una especificidad distinta a la de por la progastrina.
- 55 15. Composición para la utilización según la reivindicación 14, en la que dicho segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en: EGFR, VEGF y HER2.
16. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición comprende una pluralidad de anticuerpos que presentan unas especificidades por epítomos distintos de la progastrina.
- 60 17. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-progastrina humana se administra a una dosis de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg.
18. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la dosis de dicho anticuerpo anti-progastrina humana se administra durante una pluralidad de administraciones espaciadas temporalmente.

FIG. 1

Expresión del gen GAST en líneas celulares del cáncer de mama

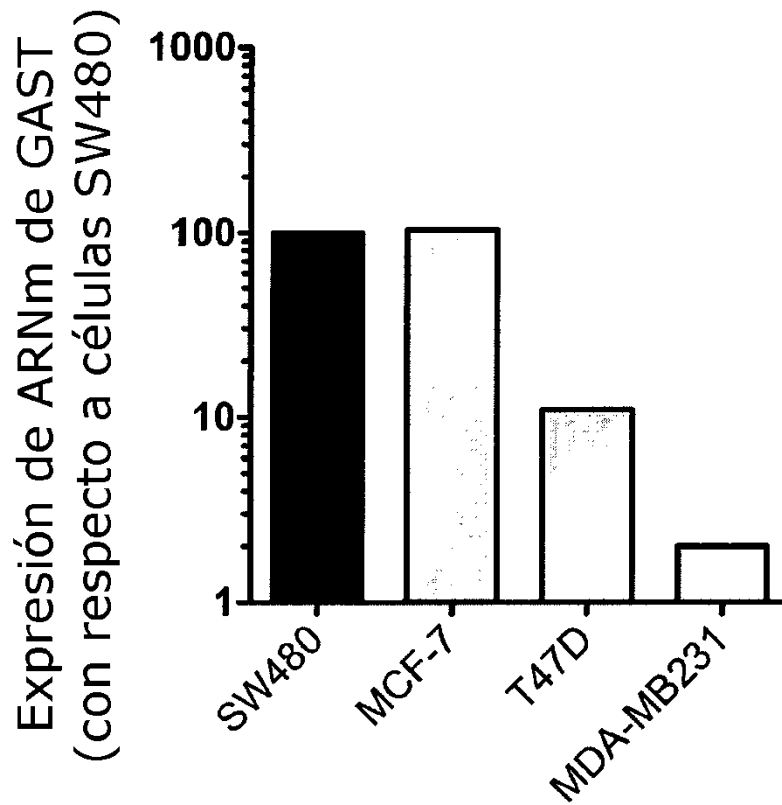


FIG. 2

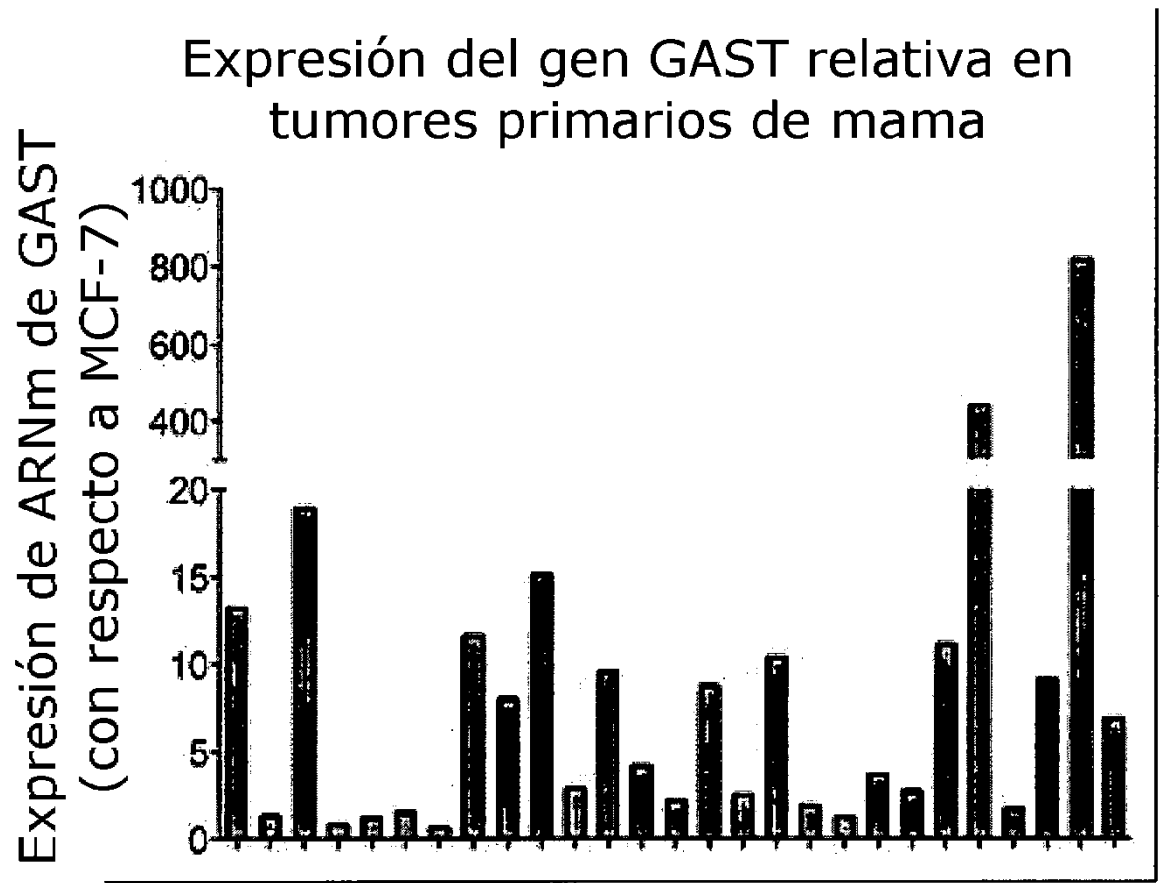


FIG. 3

Expresión del gen GAST relativa en tumores metastásicos de mama

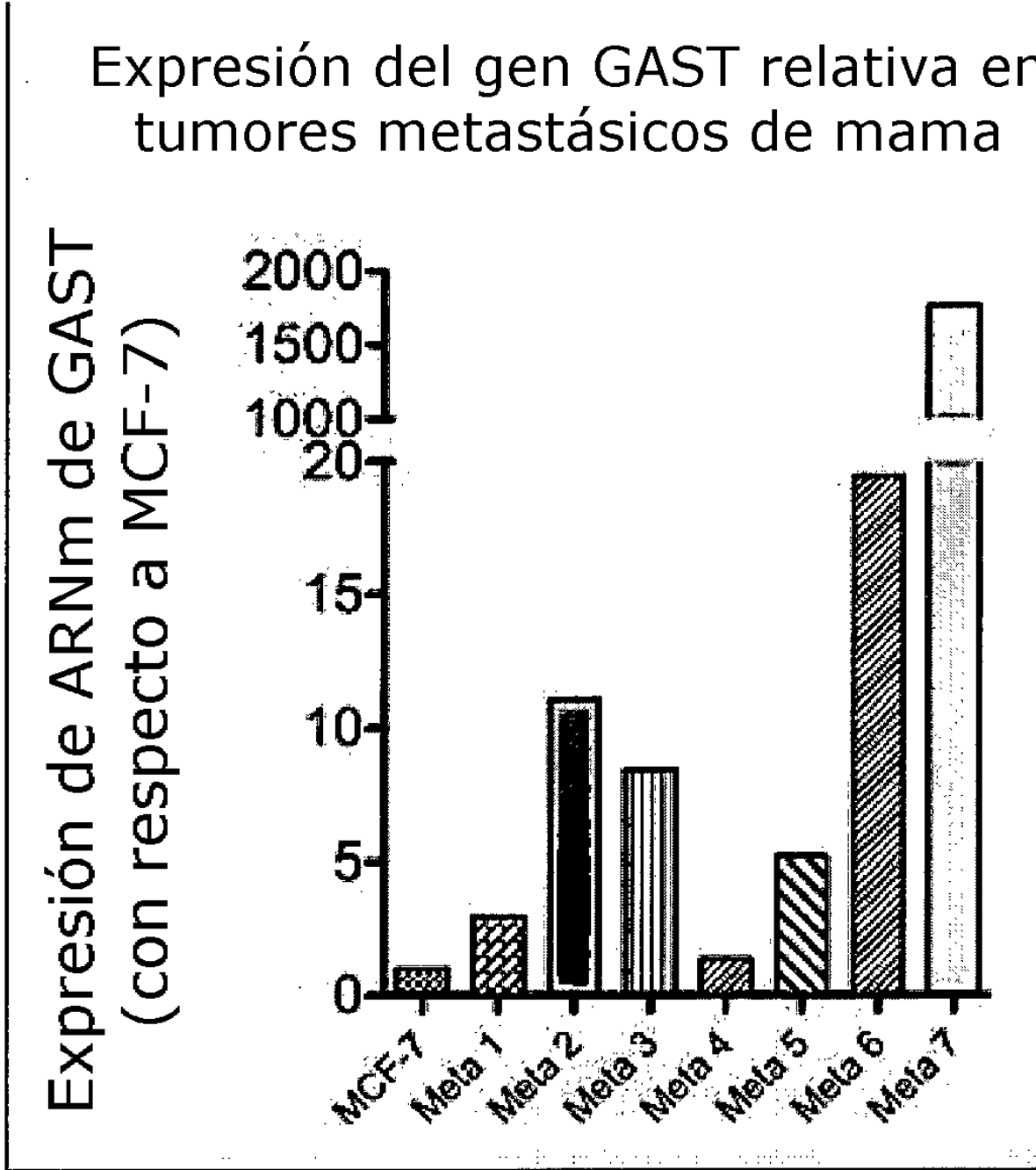


FIG. 4

Concentración de progastina en muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama metastásico

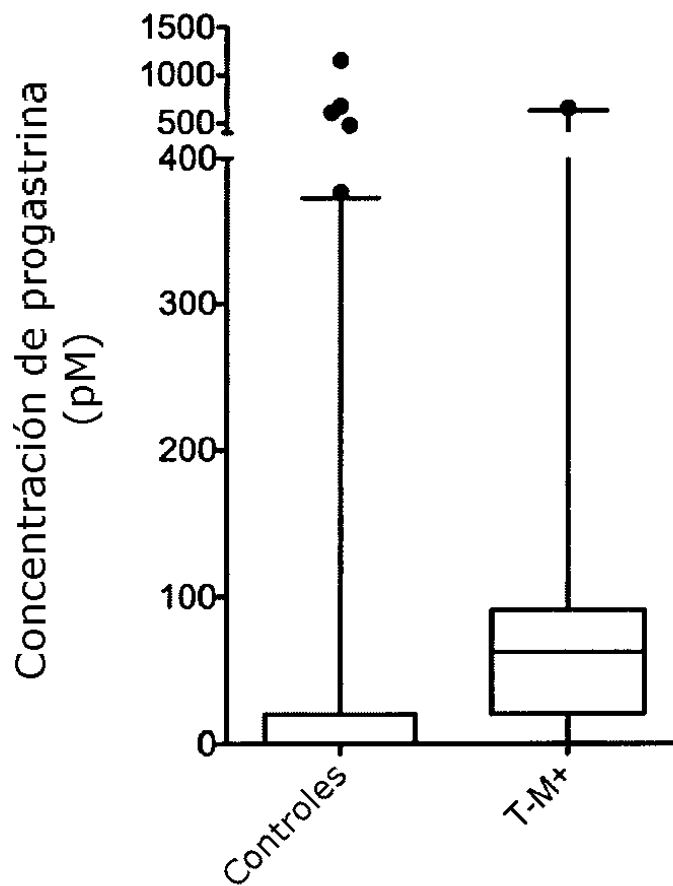


FIG. 5

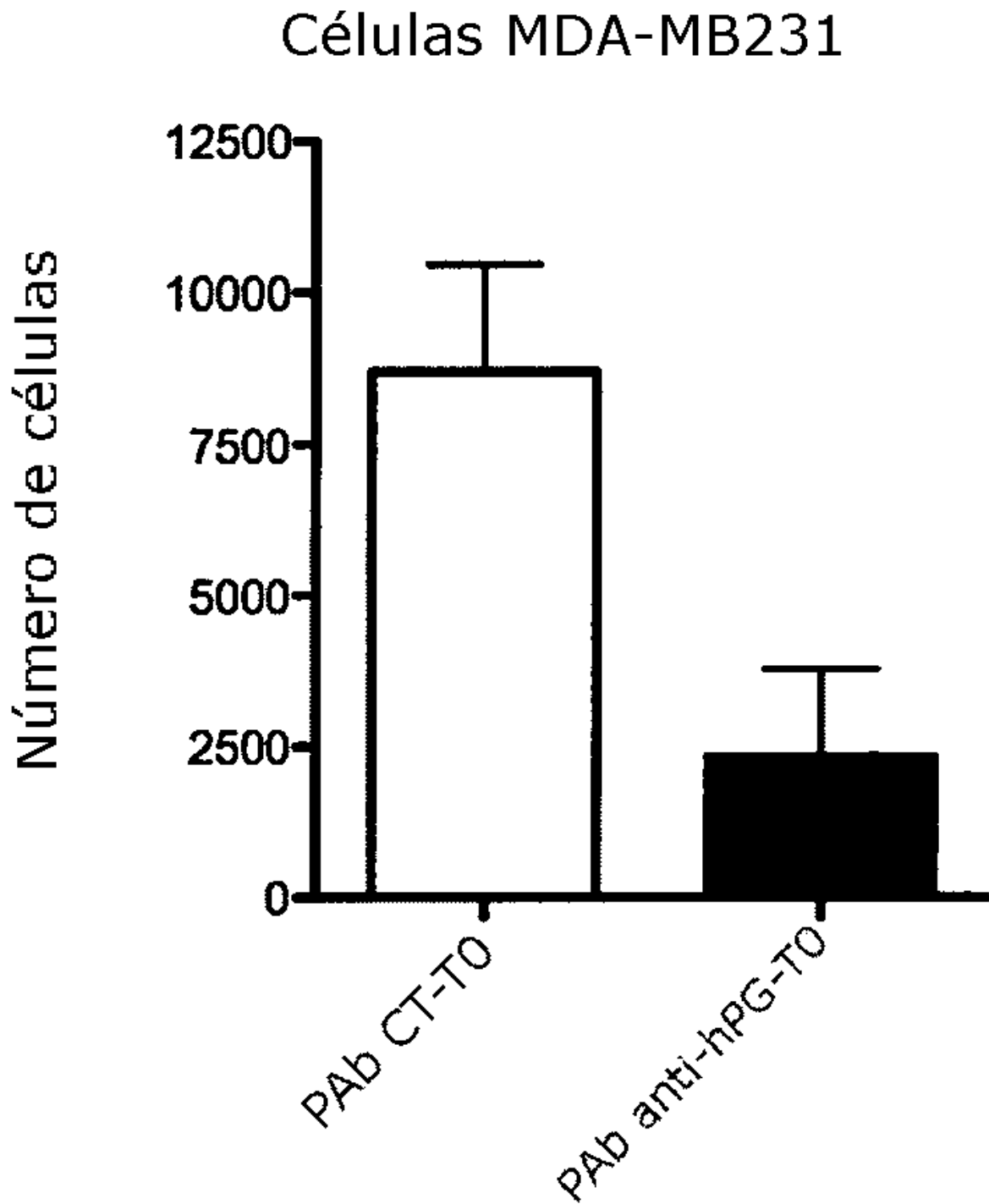


FIG. 6

MDA-MB-231

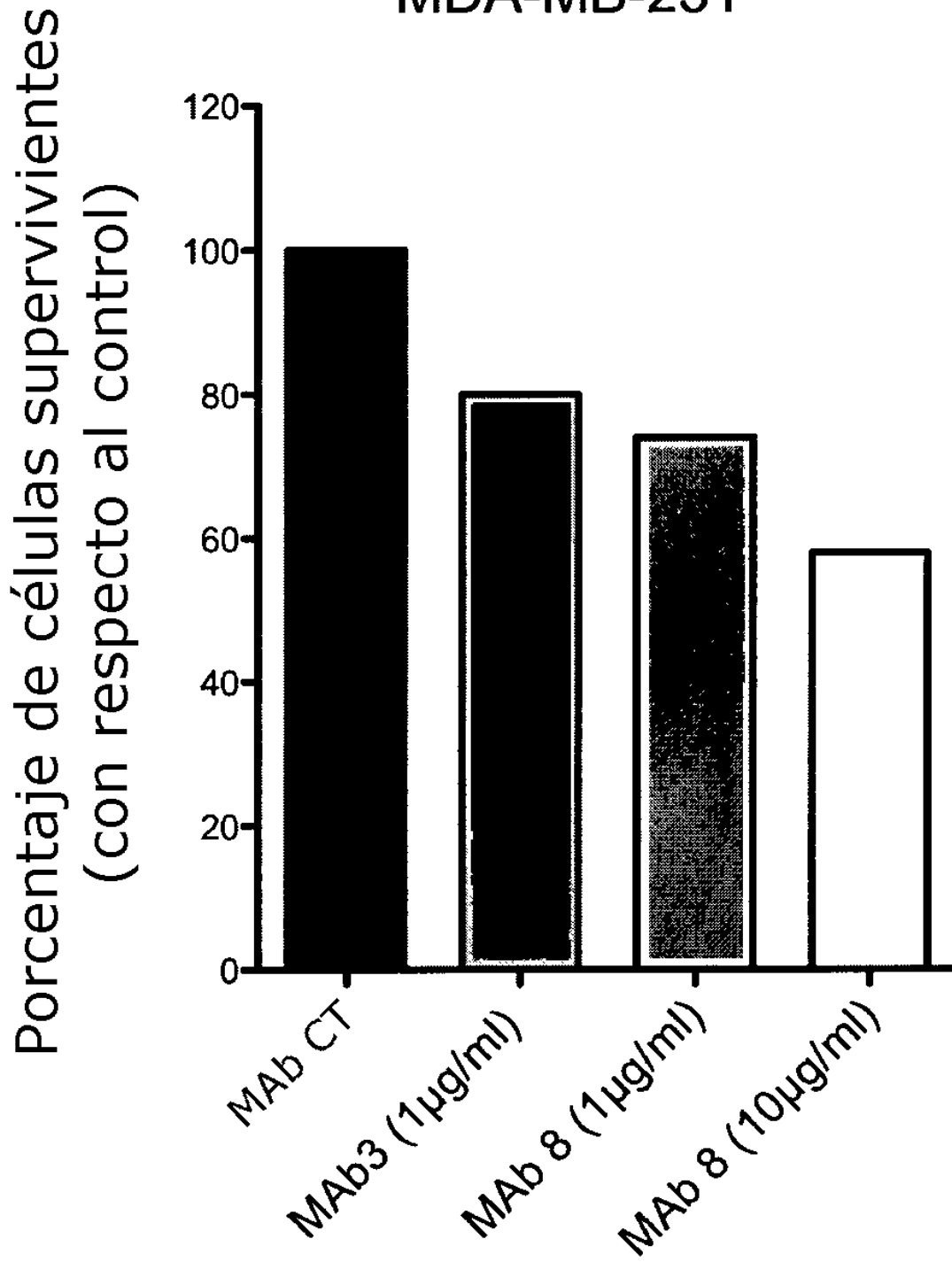
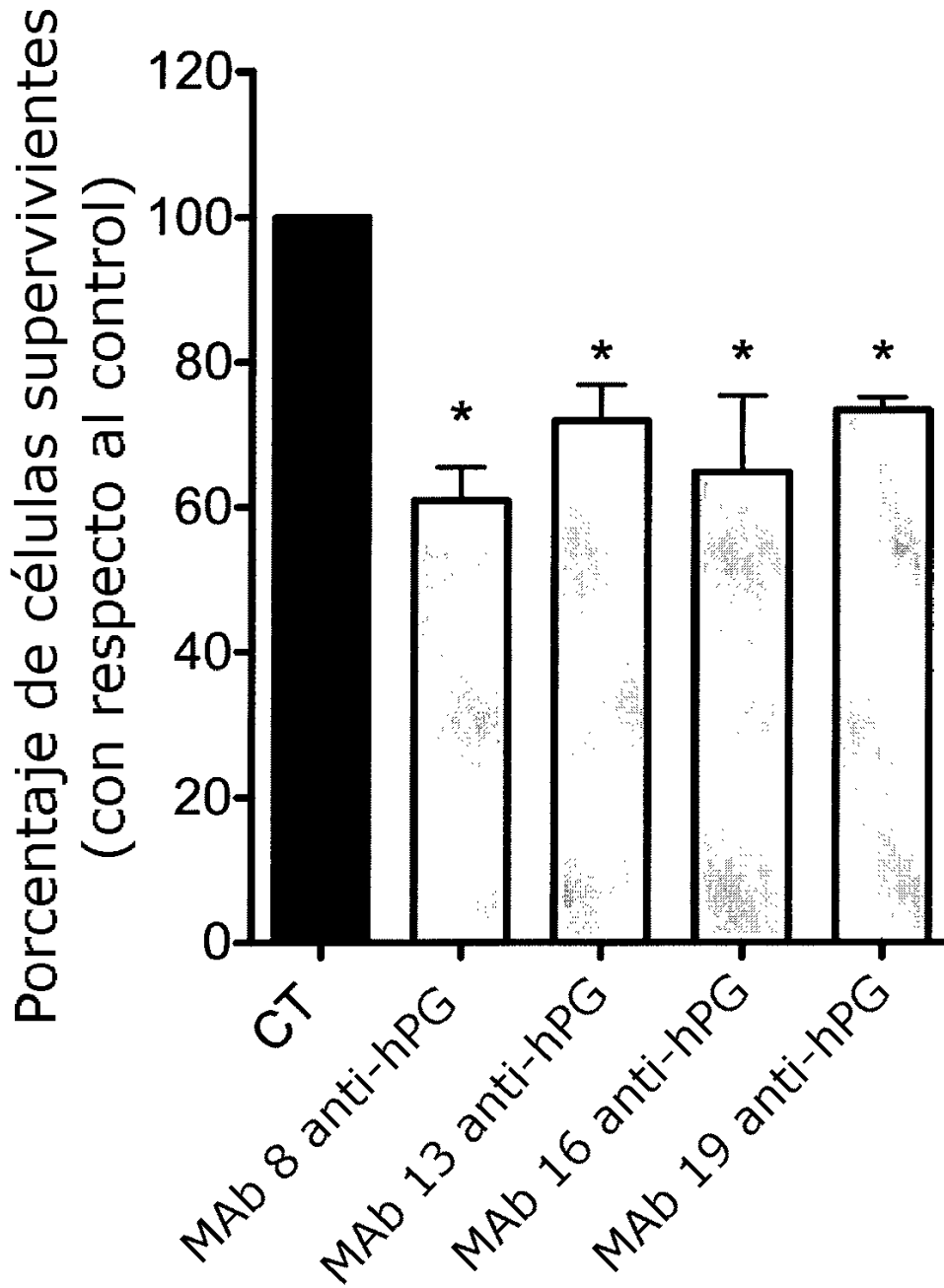


FIG. 7

MDA-MB-231



$p < 0,05$, ANOVA de una vía con ensayo de comparación múltiple de Bonferonni

FIG. 8

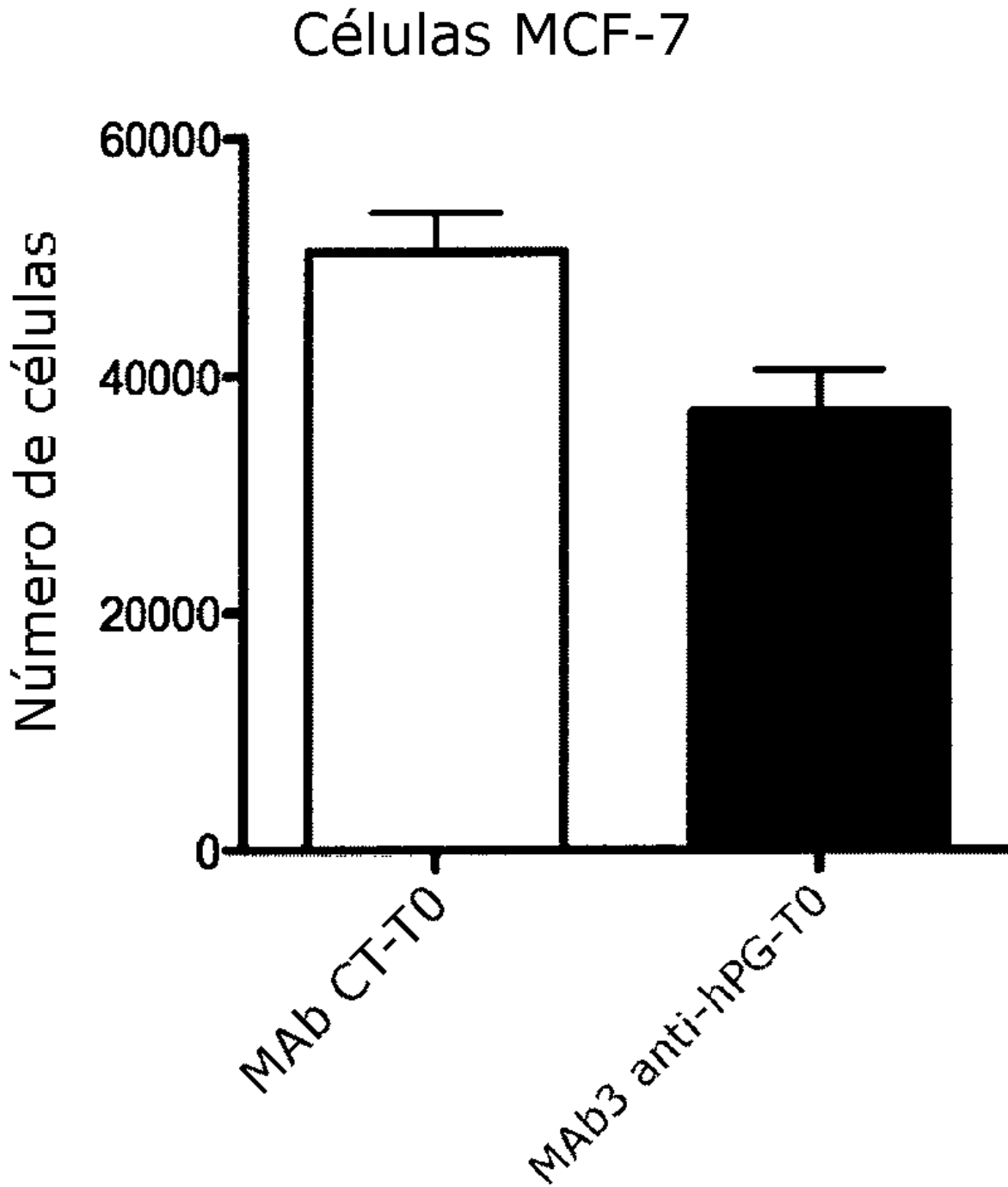


FIG. 9

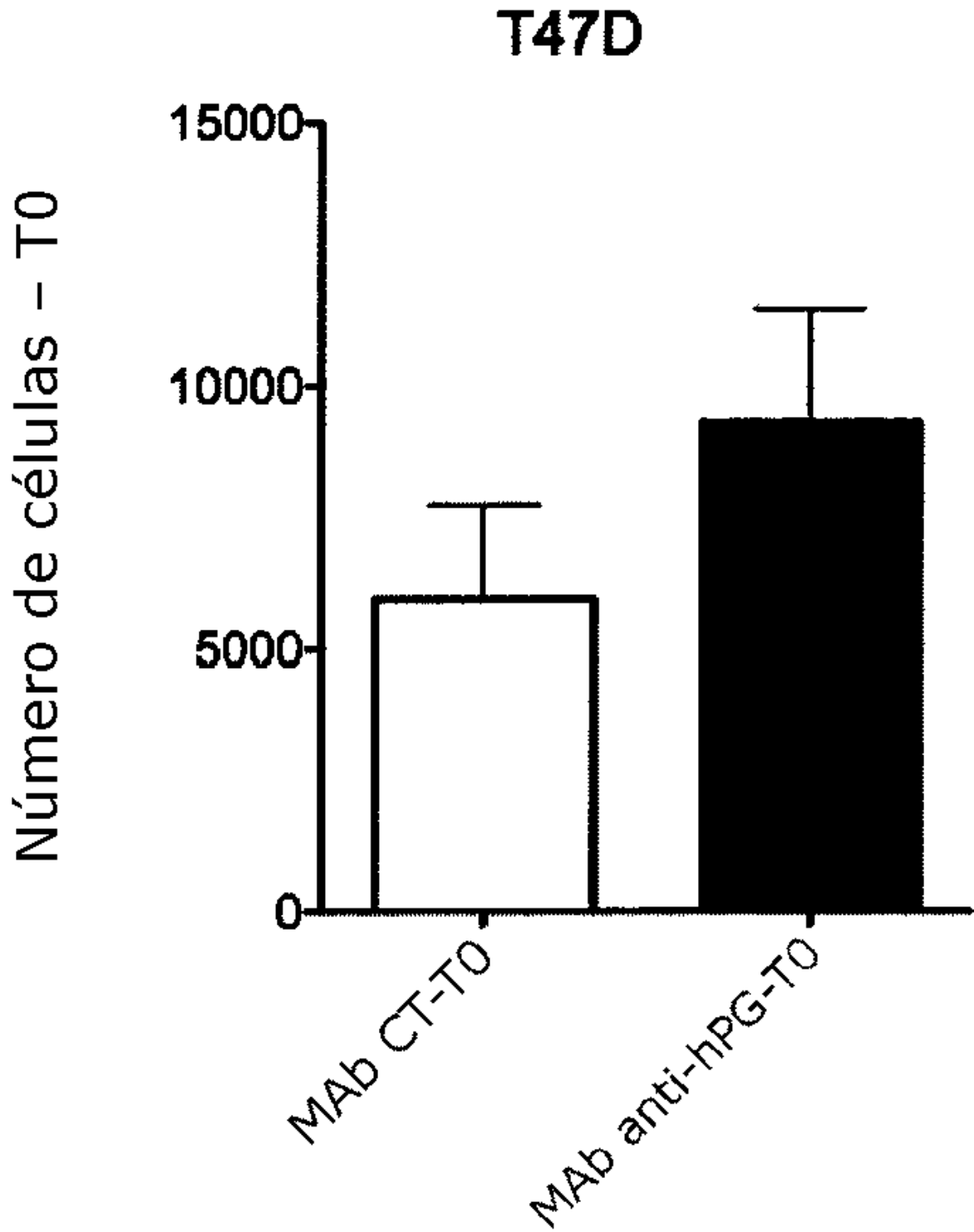


FIG. 10

Expresión del gen que codifica la progastrina en esferas de líneas celulares 3D

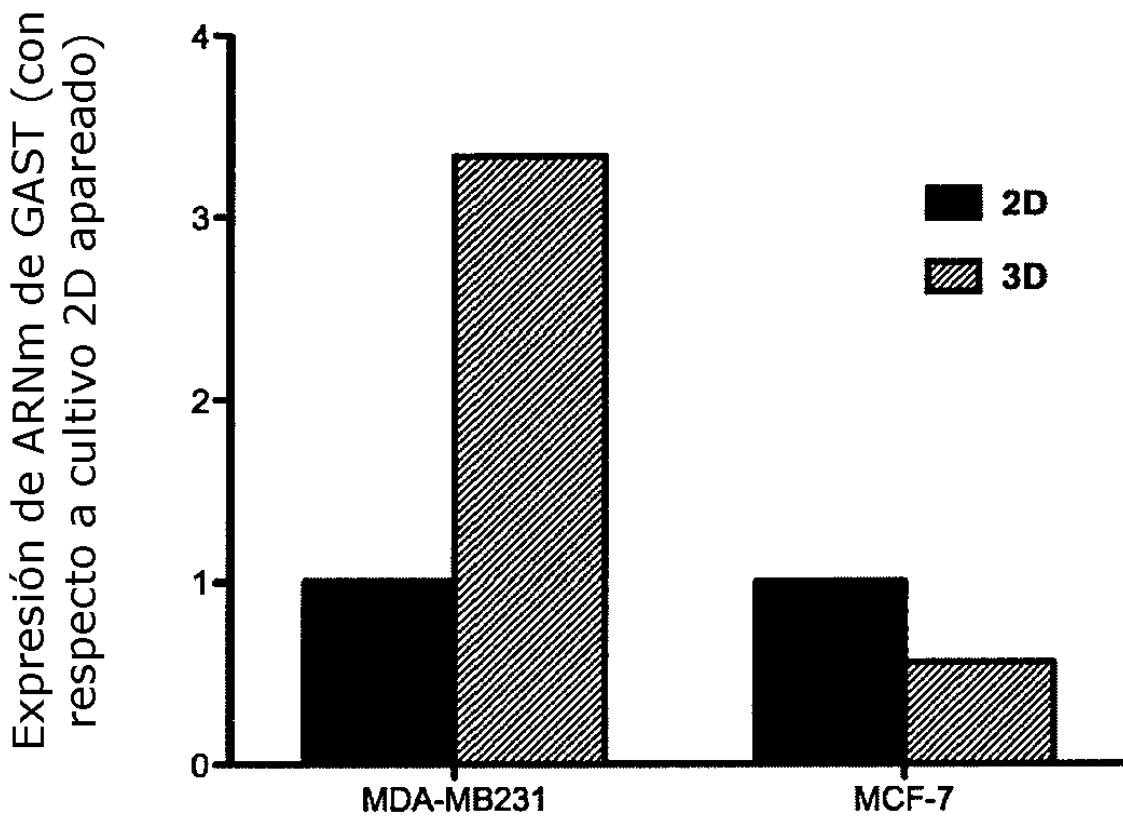
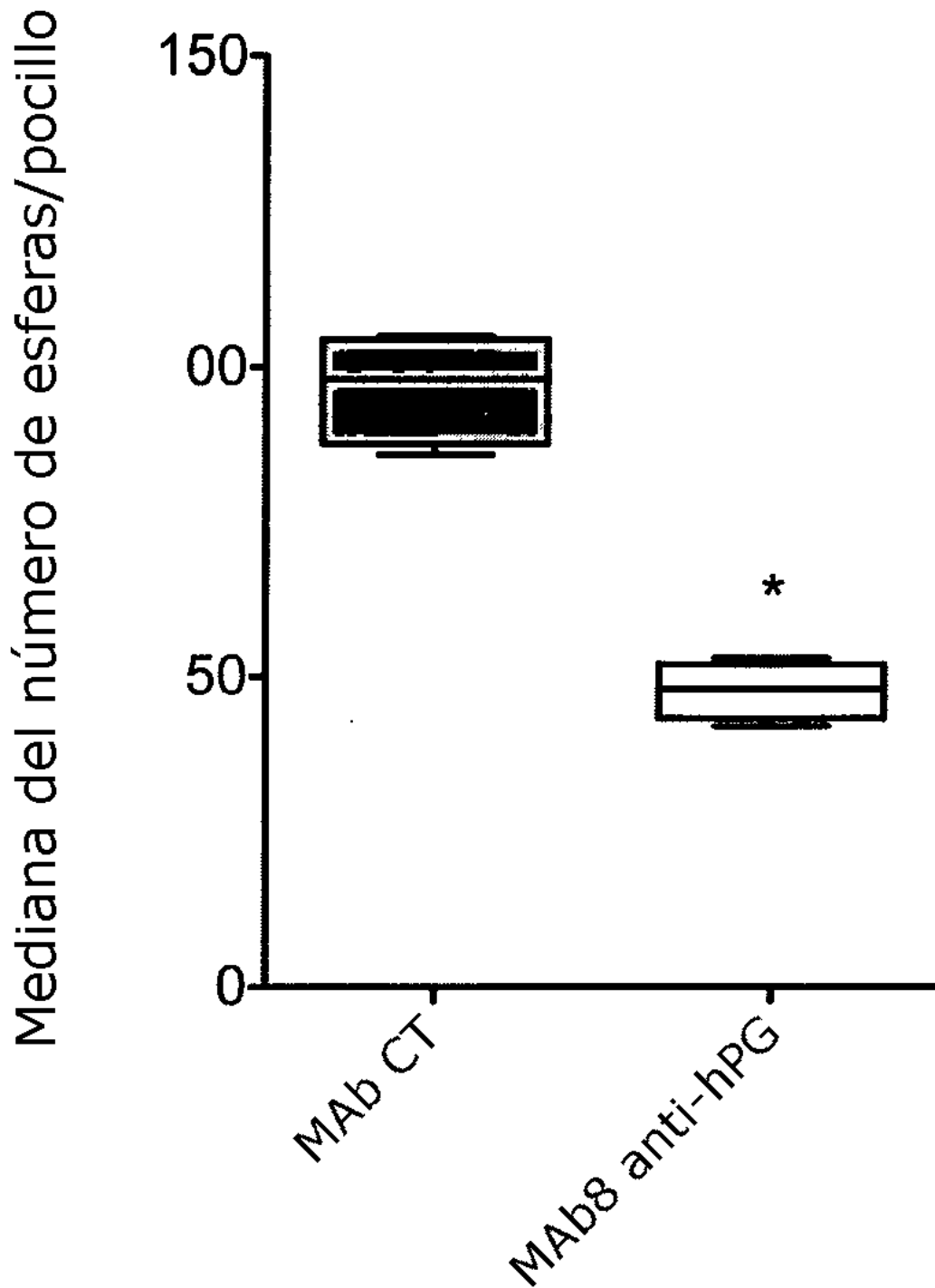


FIG. 11

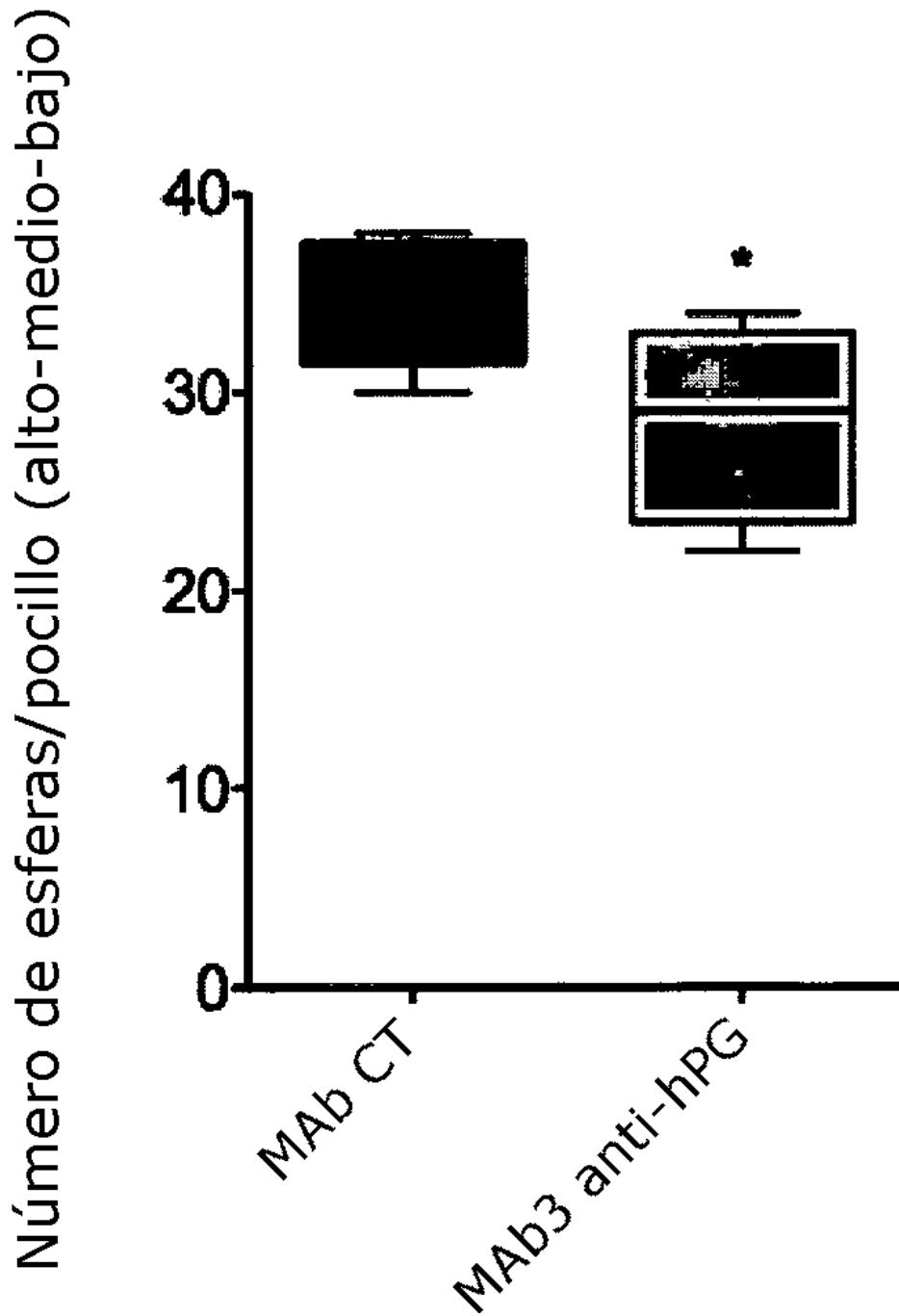
MCF-7



* p = 0,0286, Mann-Whitney

FIG. 12

Esferas de MCF-7



*, $p = 0,0398$ frente a MAb CT, ensayo de Mann-Whitney

FIG. 14A

mV_H MAb3

gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser <u>Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr</u>	
20 25 30	
tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att	144
<u>Trp</u> Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
ggt ggt ttt tat cct gga aat agt gat tct agg tac aac cag aaa ttc	192
Gly Gly <u>Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser</u> Arg Tyr Asn Gln Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ctg act gca gtc aca tcc gcc agt act gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gac ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt	288
Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
aca aga aga gat agt ccc cag tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca	336
<u>Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr</u> Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr	
100 105 110	
gtc tcc tca	345
Val Ser Ser	
115	

FIG. 14B

mV_L MAb3

gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga	48
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat agt	96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser <u>Gln Ser Ile Val His Ser</u>	
20 25 30	
aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct	144
<u>Asn Gly Asn Thr Tyr</u> Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca	192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr <u>Lys Val Ser</u> Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	
agc aga ctg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt	288
Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys <u>Phe Gln Gly</u>	
85 90 95	
tca cat gtt ccg ttc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	336
<u>Ser His Val Pro Phe Thr</u> Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	

FIG. 14C

mV_H MAb4

cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr <u>Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser</u>	
20 25 30	
tgg ata gag tgg tta aaa cag agg cct gga cat ggc ctt gag tgg att	144
<u>Trp</u> Ile Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga gag ttt tta cct gga agt ggt agt aca gac tac aat gag aag ttc	192
Gly Glu <u>Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr</u> Asp Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttc act gca gac aca tcc tcc gac aca gcc tac	240
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg cta ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt	288
Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca act gat ggt aat tat gac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act	336
<u>Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr</u> Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
ctg gtc act gtc tct gca	354
Leu Val Thr Val Ser Ala	
115	

FIG. 14D

mV_L MAb4

gat	ctt	gtg	atg	acc	caa	act	cca	ctc	tcc	ctg	cct	gtc	agt	ctt	gga	48
Asp	Leu	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	
1				5					10					15		
gat	caa	gcc	tcc	atc	tct	tgc	aga	tct	agt	cag	agc	ctt	gta	cac	agt	96
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	<u>Gln</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>His</u>	<u>Ser</u>	
			20					25					30			
agt	gga	gtc	acc	tat	tta	cat	tgg	tac	ctg	cag	aag	cca	ggc	cag	tct	144
<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
		35					40					45				
cca	aag	ctc	ctg	atc	tac	aaa	gtt	tcc	aac	cga	ttt	tct	ggg	gtc	cca	192
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	<u>Lys</u>	<u>Val</u>	<u>Ser</u>	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
	50					55					60					
gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	gga	tca	ggg	aca	gat	ttc	aca	ctc	aag	atc	240
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
65					70					75					80	
agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	ctg	gga	gtt	tat	ttc	tgc	tct	caa	agt	288
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>Ser</u>	
				85					90					95		
aca	cat	gtt	cct	ccc	acg	ttc	ggc	tcg	ggg	aca	aag	ttg	gaa	ata	aaa	336
<u>Thr</u>	<u>His</u>	<u>Val</u>	<u>Pro</u>	<u>Pro</u>	<u>Thr</u>	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100						105						110	

FIG. 14E

mV_H MAb8

gaa	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	tta	gtg	aag	cct	gga	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
1				5					10						15	
tcc	ctg	aaa	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	act	ttc	act	acc	tat	96
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	<u>Gly</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	
			20					25							30	
gcc	atg	tct	tgg	gtt	cgc	cag	act	ccg	gag	aag	agg	ctg	gag	tgg	gtc	144
<u>Ala</u>	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
			35				40								45	
gca	acc	att	agt	agt	ggt	ggt	act	tac	acc	tac	tat	cca	gac	agt	gtg	192
Ala	Thr	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
	50						55								60	
aag	ggt	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	aag	aac	gcc	cta	tac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Tyr	
65						70					75				80	
ctg	caa	atg	agc	agt	ctg	agg	tct	gag	gac	acg	gcc	atg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95	
gca	aca	cag	ggg	aat	tac	tct	ttg	gac	ttc	tgg	ggc	caa	ggc	acc	tct	336
<u>Ala</u>	<u>Thr</u>	<u>Gln</u>	<u>Gly</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Asp</u>	<u>Phe</u>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	
				100					105						110	
ctc	aca	gtc	tcc	tca												351
Leu	Thr	Val	Ser	Ser												
				115												

FIG. 14F

mV_L MA8

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly	
1 5 10 15	
aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act	96
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr	
20 25 30	
aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct	144
Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cct cag ctc ctg att tat cag atg tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca	192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
gac agg ttc agt agc agt ggg tca gga act gat ttc aca ctg aga atc	240
Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile	
65 70 75 80	
agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn	
85 90 95	
cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa	336
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
100 105 110	

FIG. 14G

mV_H MAb13

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gtg	cag	cct	gga	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aaa	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	att	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	<u>Gly</u>	<u>Phe</u>	<u>Ile</u>	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	
			20					25					30			
ggc	atg	tct	tgg	gtt	cgc	cag	tct	cca	gac	agg	agg	ctg	gag	ttg	gtc	144
<u>Gly</u>	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Asp	Arg	Arg	Leu	Glu	Leu	Val	
		35					40					45				
gca	agt	att	aat	act	ttt	ggt	gat	aga	acc	tat	tat	cca	gac	agt	gtg	192
Ala	Ser	<u>Ile</u>	<u>Asn</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gcc	aag	aac	acc	ctg	tac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	caa	atg	acc	agt	ctg	aag	tct	gag	gac	aca	gcc	att	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gca	aga	ggg	acc	gga	acc	tac	tgg	ggc	caa	ggc	acc	act	ctc	aca	gtc	336
<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	
			100					105					110			
tcc	tca															342
Ser	Ser															

FIG. 14H

mV_L MAb13

gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att gga	48
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly	
1 5 10 15	
caa cca gcc tcc atc tcc tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt	96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser <u>Gln Ser Leu Leu Asp Ser</u>	
20 25 30	
gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct	144
<u>Asp Gly Lys Thr Tyr</u> Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga gtc cct	192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr <u>Leu Val Ser</u> Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc	240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	
agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys <u>Trp Gln Gly</u>	
85 90 95	
aca cat ttt cct cag acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa	336
<u>Thr His Phe Pro Gln Thr</u> Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	

FIG. 14J

mV_L MAb16

gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tgc gtt acc att ggg	48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly	
1 5 10 15	
cgc cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta gac agt	96
Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser <u>Gln Ser Leu Leu Asp Ser</u>	
20 25 30	
gat gga aag aca tat ttg tat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct	144
<u>Asp Gly Lys Thr Tyr</u> Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct gag ctg gac tct gga gtc cct	192
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr <u>Leu Val Ser</u> Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
gac agg atc act ggc agt ggg tgc ggg aca gat ttc aca ctg aag atc	240
Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	
agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg caa gga	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys <u>Trp Gln Gly</u>	
85 90 95	
aca cat tct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	336
<u>Thr His Ser Pro Tyr Thr</u> Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	

FIG. 14K

mV_H MAb19

gat	gtg	cag	ctt	cag	gag	tcg	gga	cct	ggc	ctg	gtg	aaa	cct	tct	cag	48
Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	
1				5					10					15		
tct	ctg	tcc	ctc	aca	tgc	act	gtc	act	ggc	tac	tca	atc	acc	agt	gat	96
Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ser</u>	<u>Ile</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Asp</u>	
			20					25					30			
tat	gcc	tgg	aat	tgg	atc	cgg	cag	ttt	cca	gga	aac	aaa	ctg	gag	tgg	144
<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
atg	ggc	tac	ata	agc	ttc	agt	ggt	tac	act	agt	tac	aac	cca	tct	ctc	192
Met	Gly	Tyr	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	
	50					55					60					
aaa	agt	cga	atc	tct	gtc	act	cgg	gac	aca	tcc	agg	aac	caa	ttc	ttc	240
Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Val	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Gln	Phe	Phe	
65					70					75				80		
ctc	cag	ttg	act	tct	gtg	act	act	gag	gac	aca	gcc	aca	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gca	aga	gag	gtc	aac	tat	ggg	gac	tcc	tac	cac	ttt	gac	tac	tgg	ggc	336
<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Glu</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	<u>His</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly	
			100					105					110			
caa	ggc	acc	att	gtc	aca	gtc	tcc	tca								363
Gln	Gly	Thr	Ile	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115						120								

FIG. 14L

mV_L MAb19

caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc	48
Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc	96
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr	
20 25 30	
att gaa tgg tat cag caa cag tca ctc aag cct cct aag tat gtg atg	144
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met	
35 40 45	
gag gtt aag aaa gat gga agc cac agc aca ggt cat ggg att cct gat	192
Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp	
50 55 60	
cgc ttc tct gga tcc agt tct ggt gct gat cgc tac ctc agc att tcc	240
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser	
65 70 75 80	
aac atc cag cct gaa gat gaa gca ata tac atc tgt ggt gtg ggt gat	288
Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp	
85 90 95	
gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc	336
Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val	
100 105 110	
act gtc cta	345
Thr Val Leu	
115	

FIG. 15E

hV_H MAb8(a)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

FIG. 15F

hV_L MAb8(a)

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
 20 25 30

Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15G

hV_H MAb8(b)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

FIG. 15H

hV_L MAb8(b)

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
 20 25 30

Lys Gly Ile Thr Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15I

hV_H MAb8(c)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

FIG. 15J

hV_L MAb8(c)

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr
 20 25 30

Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15K

hV_H MAb13(a)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

FIG. 15L

hV_L MAb13(a)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15M

hV_H MAb13(b)

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser

FIG. 15N

hV_L MAb13(b)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 150

hV_H MAb16(a)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

FIG. 15P

hV_L MAb16(a)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15Q

hV_H MAb16(b)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

FIG. 15R

hV_L MAb16(b)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15S

hV_H MAb16(c)

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

FIG. 15T

hV_L MAb16(c)

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15U

hV_H MAb19(a)

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ser</u>	<u>Ile</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Asp</u>
			20					25						30	
<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75					80
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Glu</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	<u>His</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

FIG. 15W

hV_H MAb19(b)

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

FIG. 15X

hV_L MAb19(b)

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
 20 25 30

Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45

Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95

Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 100 105 110

Glu Ile Lys
 115

FIG. 15Y

hV_H MAb19(c)

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ser</u>	<u>Ile</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Asp</u>
			20					25					30		
<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75					80
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Glu</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	<u>His</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

