

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 246**

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/EP2011/000049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11083091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2011 E 11700115 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2542584**

54 Título: **Procedimientos para tratar el cáncer pancreático**

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 (C.N.R.S.) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HOUHOU, LEÏLA;
JOUBERT, DOMINIQUE y
HOLLANDE, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 657 246 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 pancreático.

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a procedimientos para tratar sujetos con cáncer pancreático primario y/o metastásico mediante la administración al sujeto de una composición que comprende un anticuerpo específico para progastrina.

10

Antecedentes

A pesar de décadas de investigación básica y clínica, el cáncer continúa siendo una de las mayores lacras de la humanidad. Según las estadísticas recopiladas por la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es una de las causas principales de fallecimientos a lo largo del mundo que ha causado la muerte de 7,4 millones de personas en 2004 o aproximadamente el 13% de todos los fallecimientos de ese año. Aunque se ha aprendido mucho con respecto a las causas del cáncer, y de cómo el cáncer actúa a nivel molecular, las mayores reducciones en tasas de fallecimientos por cáncer continúan siendo atribuibles a intervenciones de salud pública, tales como campañas anti-tabaco, y al diagnóstico precoz posibilitado por avances en la tecnología de formación de imágenes y diagnósticos moleculares. En lo que respecta a la difícil tarea de destruir realmente células del cáncer, no obstante, los médicos se basan aún en modalidades terapéuticas tales como cirugía, radiación y quimioterapia, que serían familiares para oncólogos de hace una generación. Aunque la eficacia de todos estos tratamientos ha mejorado a lo largo de los años, la mejora en tasas de curación y el aumento de la longevidad han sido graduales. Incluso las nuevas terapias dirigidas resultantes.

25

El cáncer pancreático, una neoplasia maligna del páncreas, es una forma de cáncer particularmente difícil de tratar, dado que normalmente es indetectable hasta que ya no se puede tratar ((Jemal *et al.*, 2008, CA Cancer J. Clin. 58(2):71-96)). El pronóstico es deficiente (menos del 5% de los pacientes con cáncer pancreático continúan con vida 5 años después del diagnóstico ((Jemal *et al.*, 2010, CA Cancer J. Clin. 60(5):277-300)), y una remisión completa es rara ((Ghaneh *et al.*, 2007, Gut 56(8):1134-1152)). La mediana de supervivencia desde el diagnóstico es de solo 3-6 meses ((Stathis y Moore, 2010, Nat. Rev. Clin. Oncol. 7(3):163-172)). Se ha proyectado que en 2010 se diagnosticarán aproximadamente 43.000 individuos solo en los Estados Unidos con cáncer pancreático y que aproximadamente 36.800 fallecerán por esta enfermedad (véase, www.cancer.gov/cancertopics/types/pancreatic). Aunque el cáncer pancreático solo representa el 2,5% de nuevos casos de cáncer diagnosticados cada año, es responsable del 6% de fallecimientos por cáncer al año ((Jemal *et al.*, 2007, Cancer J. Clin. 57(1):43-46)), lo que representa una de las tasas de mortandad más elevadas entre todos los cánceres. De hecho, en los Estados Unidos, el cáncer pancreático es el cuarto cáncer más mortífero entre varones y mujeres.

Otro aspecto complicado en la gestión del cáncer es el tratamiento de pacientes en los que se han liberado y migrado a otra ubicación del cuerpo células desde el tumor primario (original), normalmente a través de la linfa o la sangre, mediante un proceso denominado "metástasis," para formar otro tumor metastásico (o secundario). El tumor secundario o metastásico es normalmente del mismo tipo que el tumor original, independientemente de su nueva ubicación, de forma que la enfermedad se denomina cáncer metastásico y no cáncer del nuevo tejido huésped. Por ejemplo, el cáncer pancreático que se extendió al hígado es cáncer pancreático metastásico, no cáncer de hígado. Dado que el cáncer pancreático primario a menudo no se diagnostica hasta un estadio avanzado, la incidencia de la metástasis es elevada. De hecho, aproximadamente el 80% de pacientes presentan ya metástasis en el momento del diagnóstico ((Sohn *et al.*, 2000, J. Gastrointest. Surg. 4(6):567-579)).

La metástasis limita las opciones de tratamiento, dado que la resección o extirpación del tumor primario no es ya una opción de tratamiento suficiente. La quimioterapia basada en gemcitabina representa actualmente el patrón de cuidado para cualquier paciente con enfermedad metastásica. La supervivencia de pacientes con enfermedad metastásica tratados con gemcitabina es solo de aproximadamente 6 meses (variando de 4,0 a 7,1 meses, dependiendo del estudio). Los ensayos actuales con politerapias, por ejemplo gemcitabina con quimioterapia (oxaliplatino, 5-FU o irinotecán), o gemcitabina con tratamiento dirigido (erlotinib, bevacizumab o cetuximab) han informado de una ganancia de solo 1 a 2 meses en la supervivencia ((Sathis y Moore, 2000, Nat. Rev. Clin. Oncol. 7(3):163-172)).

Aunque se han realizado avances moderados en las opciones de tratamiento para el cáncer pancreático primario y el cáncer pancreático metastásico en años recientes (véase, *Id.*), existe aún una necesidad imperiosa de tratamientos alternativos y/o más eficaces.

Sumario

La presente invención proporciona un anticuerpo para su utilización en el tratamiento de cáncer pancreático tal como se define en las reivindicaciones.

La gastrina es una hormona peptídica del intestino que estimula la secreción de ácido gástrico. En mamíferos adultos, es producida principalmente por células G en el antro gástrico, y en alguna medida en el intestino delgado superior y en el páncreas. Con referencia a la figura 1, el gen de la gastrina se traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos, denominado "progastrina", que contiene una secuencia señal (subrayada) que se escinde, dando lugar a progastrina ("PG"), un polipéptido de 80 residuos de aminoácidos. La gastrina, que se encuentra principalmente en tres formas, G34, G17 y G14 (no ilustradas), es el resultado del procesamiento de la progastrina.

La presencia de gastrina amidada se ha observado en tumores pancreáticos ((Goetze *et al.*, 2000, Cancer 88(11):2487-2494)) y los investigadores han intentado utilizar enfoques anti-gastrina para tratar tumores pancreáticos (véase, por ejemplo, Chau *et al.*, 2006, Br. J. Cancer 94:1107-1115; Brett *et al.*, 2002, J. Clin. Oncol. 20:4225-4231). Se ha observado que los pacientes que padecen cáncer pancreático tienen niveles detectables de progastrina en sus tumores pancreáticos ((Caplin *et al.*, 2000, Br. J. Surg. 87(8):1035-1040)). Se ha descubierto ahora que se pueden utilizarse enfoques anti-progastrina para diagnosticar, realizar un seguimiento y tratar el cáncer pancreático tanto primario como metastásico. Como se ha demostrado por primera vez en la presente memoria, los pacientes con cáncer pancreático tanto primario como metastásico tienen niveles de progastrina elevados en plasma y/o suero, y la proliferación de líneas celulares derivadas de tumores pancreáticos primarios y metastásicos se inhibe cuando este se trata con anticuerpos que se unen específicamente a la progastrina, al igual que lo hace su capacidad para formar esferas del cáncer en condiciones de baja adherencia. Estos procedimientos proporcionan nuevas herramientas poderosas para diagnosticar, tratar, prevenir la recurrencia y realizar un seguimiento del transcurso de la progresión y/o el tratamiento del cáncer pancreático.

En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de tratamiento del cáncer pancreático, que puede ser cáncer pancreático primario o cáncer pancreático metastásico, que implican la administración a un sujeto al que se ha diagnosticado cáncer pancreático primario o metastásico de una cantidad de un anticuerpo que se une específicamente a progastrina ("anticuerpo anti-PG") eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. El anticuerpo anti-PG puede administrarse solo como monoterapia o conjuntamente con, o además de, otras modalidades de tratamiento, tales como extirpación del tumor, radioterapia, quimioterapia, etc.

La progastrina está asociada con el cáncer (documento WO 2008/076454; Smith *et al.*, Am J Physiol. 268(1 Pt 2): R135-R141, 1995; Siddheshwar *et al.*, Gut, 48(1): 47-52, 2001; Konturek *et al.*, Dig Dis Sci. 51(4): 779-787, 2006; Bardram, Gastroenterology. 98(6): 1420-1426, 1990; Matters *et al.*, Pancreas. 38(5): e151-161, 2009). Se ha informado de anticuerpos monoclonales contra progastrina, aunque no está claro si estos anticuerpos realmente se unen a la progastrina (documento WO 2006/032980)

Cuando se utiliza conjuntamente con, o además de, extirpación del tumor, el anticuerpo anti-PG puede administrarse antes y/o después de la extirpación del tumor, y se puede seguir administrando durante un periodo de tiempo específico después de la extirpación del tumor, hasta que se logre un nivel de progastrina en plasma y/o suero inferior a un nivel umbral, o hasta que se logre una reducción en los niveles de progastrina en plasma y/o suero a lo largo de un periodo de tiempo especificado.

Cuando se utiliza conjuntamente con, o además de, quimioterapia, el anticuerpo anti-PG puede administrarse antes de la quimioterapia, concomitantemente con la quimioterapia o después de la quimioterapia. De nuevo, el anticuerpo anti-PG puede administrarse durante un periodo de tiempo especificado, hasta que se logre un nivel de progastrina en plasma y/o suero inferior a un nivel umbral especificado o hasta que se logre una reducción en niveles de progastrina en plasma y/o suero a lo largo de un periodo de tiempo especificado.

Como se aborda con más detalles más adelante, los pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer pancreático primario y/o metastásico tienen niveles de PG elevados en plasma y/o suero. Por ejemplo, con referencia a la figura 4, los niveles de progastrina en suero y/o plasma en individuos sanos son normalmente despreciables. Los individuos que padecen cáncer pancreático tienen niveles medibles de aproximadamente 50 pM. Este descubrimiento ha provocado la aparición de varias herramientas nuevas útiles e importantes en el diagnóstico y la gestión del cáncer pancreático.

En primer lugar, dado que puede ser difícil diagnosticar el cáncer pancreático, pueden utilizarse niveles de PG en plasma y/o suero medidos conjuntamente con otras pruebas de diagnóstico para confirmar un diagnóstico de cáncer pancreático o para ayudar a elaborar el diagnóstico inicial. Por ejemplo, se sabe generalmente que los signos de cáncer pancreático, cuando están presentes, son similares a los signos de muchas otras enfermedades. Los síntomas comunes incluyen dolor en el abdomen superior que se irradia a la espalda, pérdida de apetito y/o náuseas y vómitos, pérdida de peso significativa e ictericia indolora. Otros síntomas menos comunes incluyen trombosis de vena distal y embolismo pulmonar, diabetes mellitus y pancreatitis. Dado que la detección precoz proporciona mayores opciones de tratamientos y un mejor diagnóstico, podrían medirse niveles de PG en plasma y/o suero en pacientes que presentan estos y/u otros síntomas de cáncer pancreático para ayudar a elaborar el diagnóstico, pudiendo indicar un nivel elevado, por ejemplo un nivel en plasma y/o suero

superior a 50 pM, que el paciente padece cáncer pancreático.

La medición de niveles de PG en plasma y/o suero para ayudar a elaborar el diagnóstico puede ser particularmente útil en sujetos que presentan factores de riesgo de cáncer pancreático, incluidos, pero sin limitación, tabaquismo, factores dietéticos y ambientales, infección por *H. pylori*, síndromes metabólicos (por ejemplo, obesidad, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de larga duración) e historial familiar, que supone aproximadamente el 5-10% de pacientes con cáncer pancreático ((Maisonneuve y Lowenfels, 2010, Dig. Dis. 28(4-5):645-656)). Podría realizarse un seguimiento de los niveles de PG en plasma y/o suero en sujetos que presentan dichos, u otros, factores de riesgo periódicamente, indicando aumentos observados a lo largo del tiempo, o un nivel observado de un valor umbral de aproximadamente 50 pM o superior, que el individuo puede estar desarrollando un cáncer pancreático. Dicho seguimiento de individuos en riesgo podría ayudar en la detección precoz de la enfermedad, proporcionando mejores opciones de tratamiento.

En segundo lugar pueden utilizarse niveles de PG en plasma y/o suero medidos para realizar un seguimiento de la eficacia de un tratamiento cualquiera del cáncer pancreático, incluidos los tratamientos anti-PG descritos en la presente memoria, y/o una recurrencia o una metástasis potenciales. Aunque sin pretender vincularse a ninguna teoría de operación particular, se espera que, dado que los tumores se reducen con el transcurso del tratamiento, los niveles de PG en plasma y/o suero disminuyan, y pueden volverse normales.

Por lo tanto, en otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos útiles para diagnosticar y/o realizar un seguimiento del tratamiento y/o la recurrencia del cáncer pancreático, ya sea cáncer pancreático primario o cáncer pancreático metastásico, en un sujeto. El procedimiento comprende, en general, la medición de un nivel de PG en plasma y/o suero en un sujeto relevante, en un punto temporal distinto o a lo largo de un periodo de tiempo, y determinar si el nivel es superior o inferior a un nivel umbral, o aumenta o se reduce con el tiempo. Los niveles superiores a un nivel umbral, o niveles que aumentan con el tiempo en sujetos con riesgo de desarrollar cáncer pancreático, o en sujetos que muestran uno o varios síntomas asociados con el cáncer pancreático, son indicativos de que el sujeto padece cáncer pancreático. Los niveles inferiores a un nivel umbral, o que disminuyen con el tiempo, son indicativos de que el tratamiento particular es eficaz. En vista del reducido tiempo de supervivencia en pacientes que tienen cáncer pancreático, las mediciones deberían tomarse de forma razonable con frecuencia, por ejemplo una vez cada dos semanas, o a intervalos incluso más cortos.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona secuencias de aminoácidos de progastrina humana (SEC ID n°: 100), en las que la secuencia peptídica señal está subrayada, progastrina humana madura (SEC ID n°: 20) 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).

La figura 2 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 2A proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb3 anti-hPG murino (SEC ID n°: 12) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 16);

La figura 2B proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb3 anti-hPG murino (SEC ID n°: 13) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 17);

La figura 2C proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb4 anti-hPG murino (SEC ID n°: 14) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 18);

La figura 2D proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb4 anti-hPG murino (SEC ID n°: 15) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 19);

La figura 2E proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb8 anti-hPG murino (SEC ID n°: 59) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 67);

La figura 2F proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb8 anti-hPG murino (SEC ID n°: 63) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 71);

La figura 2G proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb13 anti-hPG murino (SEC ID n°: 60) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 68);

La figura 2H proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb13 anti-hPG murino (SEC ID n°: 64) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 72);

- La figura 2I proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb16 anti-hPG murino (SEC ID n°: 61) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 69);
- 5 La figura 2J proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb16 anti-hPG murino (SEC ID n°: 65) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 73);
- La figura 2K proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb19 anti-hPG murino (SEC ID n°: 62) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 70); y
- 10 La figura 2L proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb19 anti-hPG murino (SEC ID n°: 66) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID n°: 74);
- La figura 3 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:
- 15 La figura 3A proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb3 humanizado (SEC ID n°: 21);
- 20 La figura 3B proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb3 humanizado (SEC ID n°: 22);
- La figura 3C proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb4 humanizado (SEC ID n°: 23);
- 25 La figura 3D proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb4 humanizado (SEC ID n°: 24);
- La figura 3E proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb8(a) humanizado (SEC ID n°: 75);
- 30 La figura 3F proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(a) humanizado (SEC ID n°: 76);
- 35 La figura 3G proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb8(b) humanizado (SEC ID n°: 77);
- La figura 3H proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(b) humanizado (SEC ID n°: 78);
- 40 La figura 3I proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb8(c) humanizado (SEC ID n°: 79);
- La figura 3J proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(c) humanizado (SEC ID n°: 76);
- 45 La figura 3K proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb13(a) humanizado (SEC ID n°: 80);
- 50 La figura 3L proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb13(a) humanizado (SEC ID n°: 81);
- La figura 3M proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb13(b) humanizado (SEC ID n°: 82);
- 55 La figura 3N proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb13(b) humanizado (SEC ID n°: 83);
- La figura 3O proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb16(a) humanizado (SEC ID n°: 84);
- 60 La figura 3P proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(a) humanizado (SEC ID n°: 85);
- 65 La figura 3Q proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb16(b) humanizado (SEC ID n°: 86);

- La figura 3R proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(b) humanizado (SEC ID n°: 87);
- 5 La figura 3S proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb16(c) humanizado (SEC ID n°: 88);
- La figura 3T proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(c) humanizado (SEC ID n°: 89);
- 10 La figura 3U proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb19(a) humanizado (SEC ID n°: 90);
- La figura 3V proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(a) humanizado (SEC ID n°: 91);
- 15 La figura 3W proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb19(b) humanizado (SEC ID n°: 92);
- La figura 3X proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(b) humanizado (SEC ID n°: 93);
- 20 La figura 3Y proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb19(c) humanizado (SEC ID n°: 94); y
- 25 La figura 3Z proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(c) humanizado (SEC ID n°: 95);
- La figura 4 proporciona un gráfico que ilustra concentraciones de progastrina en plasma o suero de pacientes con cáncer pancreático primario (M-) o metastásico (M+), en comparación con controles sanos.
- 30 La figura 5 proporciona un gráfico que ilustra la expresión de niveles de progastrina en diversos tipos de líneas celulares de cáncer pancreático primario y metastásico.
- La figura 6 proporciona un gráfico que ilustra la secreción de progastrina en diversos tipos de líneas celulares de cáncer pancreático primario y metastásico.
- 35 La figura 7 proporciona un gráfico que compara las propiedades antiproliferativas de MAb3 anti-hPG ejemplificativo sobre células Capan 1 (células de tumor pancreático metastásico) en comparación con un anticuerpo monoclonal de control negativo.
- 40 La figura 8 proporciona un gráfico que compara las propiedades antiproliferativas de MAb8 anti-hPG ejemplificativo sobre células BxPC-3 (células de tumor pancreático primario) en comparación con un anticuerpo monoclonal de control negativo.
- 45 La figura 9 proporciona un gráfico que compara las propiedades antiproliferativas de MAb8 anti-hPG ejemplificativo sobre células MIA PaCa2 (células de tumor pancreático primario) en comparación con un anticuerpo monoclonal de control negativo.
- La figura 10 proporciona un gráfico que demuestra la propiedad inhibidora de Mab3 anti-hPG ejemplificativo sobre la capacidad a largo plazo de células Capan 1 (células de tumor pancreático metastásico) para formar esferas de cáncer en condiciones de baja adherencia en comparación con células de control no tratadas.
- 50 La figura 11 proporciona un gráfico que demuestra la propiedad inhibidora de MAb8, MAb13, MAb16 y MAb19 anti-hPG ejemplificativos sobre la capacidad a largo plazo de células SU.86.86 (células de tumor pancreático metastásico) para formar esferas de cáncer en condiciones de baja adherencia en comparación con células de control no tratadas.
- 55

Descripción detallada

60 1.1 Cáncer pancreático

El páncreas, una glándula delgada de aproximadamente seis pulgadas de longitud, tiene dos funciones principales: producir jugos que ayudan a digerir la comida y producir hormonas, tales como insulina y glucagón, que ayudan a controlar los niveles de azúcar en sangre. Los jugos digestivos son producidos por células pancreáticas exocrinas y las hormonas por células pancreáticas endocrinas. Aproximadamente el 95% o más de

los cánceres pancreáticos se origina en células exocrinas ((Yao *et al.*, 2007, *Oncology* 14(12):3492-3450)). De los cánceres pancreáticos exocrinos, aproximadamente el 95% son adenocarcinomas, incluyendo el 5% restante carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células en anillo de sello, carcinomas hepatoides, carcinomas coloides, carcinomas no diferenciados y carcinomas no diferenciados con células gigantes semejantes a osteoclastos (véase, <http://pathology.jhu.edu/pancreas/BasicTypes1.php>).

El cáncer pancreático precoz no produce generalmente síntomas ((Jemal *et al.*, 2008, *CA Cancer J. Clin.* 58(2):71-96)), y los síntomas producidos por el cáncer pancreático en un estadio avanzado son habitualmente variados y no específicos ((Stathis y Moore, 2010, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7(3):163-172)). Como consecuencia, el cáncer pancreático no se diagnostica generalmente hasta que está avanzado ((Jemal *et al.*, 2008, *CA Cancer J. Clin.* 58(2):71-96)). Los síntomas comunes incluyen, pero sin limitación, dolor en el abdomen superior y dolor de espalda, pérdida de apetito y/o náuseas y vómitos, pérdida de peso significativa, ictericia indolora, trombosis de vena distal, embolismo pulmonar, así como diabetes mellitus y/o pancreatitis.

Están asociados con el cáncer pancreático diversos factores de riesgo, que incluyen, pero sin limitación, tabaquismo; diabetes de larga duración; pancreatitis crónica y determinadas afecciones hereditarias, tales como pancreatitis hereditaria, síndrome de neoplasia endocrina múltiple de tipo 1, cáncer de colon no polipósico hereditario, (HNPCC; síndrome de Lynch), síndrome de von-Hippel-Lindau, ataxia-telangiectasia, y el síndrome de melanoma y lunares atípicos múltiples familiares (FAMMM).

Los procedimientos de diagnóstico utilizados para diagnosticar cáncer pancreático incluyen estudios de imagenología tales como barrido de tomografía computerizada (CT), imagenología por resonancia magnética (MRI), barrido de tomografía de emisión de positrones (PET), ultrasonido endoscópico (EUS), laparoscopia, colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP) colangiografía transhepática precutánea (PTC), pero el diagnóstico definitivo se realiza mediante biopsia de aguja endoscópica o escisión quirúrgica de tejido radiológicamente sospechoso. Estas diversas técnicas de diagnóstico también se utilizan para clasificar el cáncer en estadios, lo que afecta a las opciones de tratamiento. Se utilizan habitualmente los estadios siguientes para evaluar el cáncer pancreático:

Estadio 0 (carcinoma in situ): En este estadio, las células anormales se encuentran en el revestimiento del páncreas. Estas células anormales pueden volverse cancerosas y extenderse al tejido circundante.

Estadio I: En este estadio el cáncer se ha formado y se encuentra solo en el páncreas. El estadio I se divide adicionalmente en dos subestadios, en función del tamaño del tumor: Estadio IA (el tumor es de 2 cm o más pequeño) y Estadio IB (el tumor es mayor de 2 cm).

Estadio II: En este estadio, el cáncer se ha extendido a tejidos y órganos cercanos y puede haberse extendido a los ganglios linfáticos. Este estadio se divide adicionalmente en subestadios sobre la base de dónde se ha extendido el cáncer. Estadio IA (se ha extendido a tejido y órganos cercanos, pero no a la linfa); y Estadio IIB (se ha extendido a la linfa y posiblemente a otros tejidos y órganos cercanos).

Estadio III: En este estadio, el cáncer se ha extendido a los vasos sanguíneos principales cerca del páncreas, y también puede haberse extendido a ganglios linfáticos cercanos.

Estadio IV: En este estadio, el cáncer puede ser de cualquier tamaño, se ha extendido a tejidos y órganos distantes, tales como el hígado, los pulmones y la cavidad peritoneal (es decir, el cáncer se ha metastatizado).

Existen tres opciones de tratamiento principales (cirugía, radioterapia y quimioterapia), que varían por estadio. Los tratamientos para el Estadio I y el Estadio II de cáncer pancreático primario incluyen cirugía, con quimioterapia complementaria basada en gemcitabina o en un régimen de 5-FU, con o sin radioterapia.

Muchas veces, el cáncer pancreático primario recurre después del tratamiento (se denomina cáncer pancreático recurrente). La quimioterapia basada en gemcitabina se utiliza también generalmente para pacientes con cáncer pancreático recurrente y localmente avanzado, a veces seguida por radiación o por quimiorradiación

1.2 Metástasis

Como se ha indicado en la sección Antecedentes, metástasis se refiere al proceso por el que se extiende el cáncer. 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 pancreático que se extendido a otros tejidos se denomina "cáncer pancreático metastásico" independientemente del tejido de ubicación del tumor metastásico secundario.

Las células del cáncer se extienden frecuentemente a ganglios linfáticos cercanos al tumor primario, lo que se

denomina afectación de ganglios linfáticos o enfermedades regional.

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 del tumor primario e invaden tejido sano adyacente. Para realizar esto, las células tumorales deben volverse móviles, y se ha formulado la hipótesis de que experimentan una transformación fenotípica, denominada transición epitelial a mesenquimal. Kalluri, R., *et al.*, 2009, J. Clin. Invest., 119(6), 1420-28. Además, dichas células producen a menudo enzimas que degradan la matriz extracelular, facilitando de esta forma la migración fuera del tumor primario y al tejido sano circundante. Cuando una célula tumoral 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 tumoral aberrante se propaga después a través del sistema circulatorio o del sistema linfático a un nuevo órgano o a un ganglio linfático. La célula tumoral 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 tumorales 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.

Los tumores pueden extenderse por metástasis a casi cualquier parte del cuerpo. La recurrencia local, la metástasis hepática y la extensión peritoneal son las ubicaciones más comunes de recurrencia después de la extirpación de tumores pancreáticos. La invasión locoregional típica se encuentra en el tejido nervioso retropancreático, el duodeno, la vena porta (PV) y la vena mesentérica superior (SMV), o ganglios linfáticos regionales. Las ubicaciones más habituales de metástasis distante en cáncer pancreático son el hígado y la cavidad peritoneal. Otras ubicaciones menos comunes son los pulmones, los huesos y el cerebro. También se ha informado de ubicaciones inusuales tales como los músculos, la piel, el corazón, la pleura, el estómago, el ombligo, los riñones, el apéndice, el cordón espermático y la próstata ((Howard, 1996, Curr. Prob. Cancer 20(5):281-328; Borad *et al.*, 2009, Yale J. Biol. Med. 82(1):1-6)).

1.3 Tratamiento de cáncer pancreático primario y metastásico

Los pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer pancreático tienen normalmente un pronóstico deficiente, en parte debido a que el cáncer pancreático habitualmente no ocasiona síntomas precoces, lo que conduce a una enfermedad avanzada o metastásica en el momento del diagnóstico. Las opciones de tratamiento, indicadas anteriormente, dependen del estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico.

1.4 Anticuerpos anti-hPG y sus efectos sobre el cáncer pancreático primario y metastásico

Como se divulga en la presente memoria, se ha observado que los sujetos con cáncer pancreático tienen niveles detectables de progastrina en sus tumores pancreáticos ((Caplin *et al.*, 2000, Br. J. Surg. 87(8):1035-1040)). Los datos de los que se informa en la presente memoria y que se discuten en la sección de Ejemplos demuestran que las líneas celulares de cáncer pancreático BxPC-3, MIA PaCa-2, Capan 1 y SU.86.86 expresan el ARNm para el gen que codifica la progastrina (GAST) (Ejemplo 7) y también que las líneas de células del cáncer pancreático segregan progastrina (Ejemplo 8). Se ha descubierto ahora que los pacientes con cáncer pancreático primario y metastásico tienen niveles elevados de progastrina en plasma y/o suero (Ejemplo 6), que el crecimiento de células derivadas de tumores pancreáticos primarios y metastásicos está inhibido por el tratamiento con anticuerpos que se unen específicamente a progastrina humana ("hPG") (Ejemplos 9, 10 y 11) y que la capacidad de células del cáncer pancreático para crecer como esferas tumorales en condiciones de cultivo de baja adherencia se reduce significativamente después del pretratamiento con anticuerpos anti-hPG (Ejemplo 12). Sobre la base de estos descubrimientos sorprendentes y alentadores, se espera que dichos anticuerpos anti-hPG puedan utilizarse para ayudar a diagnosticar cáncer pancreático, realizar un seguimiento de la eficacia del régimen de tratamiento contra el cáncer pancreático, tratar el cáncer pancreático en cualquier estadio de desarrollo, incluidos el cáncer pancreático primario y el metastásico, y prevenir la recurrencia del cáncer pancreático.

Como se ha demostrado recientemente por Hollande *et al.*, la progastrina estimula la ruta beta-catenina/Tcf-4 de células del cáncer colorrectal suprimiendo ICAT, un regulador negativo de señalización de beta-catenina/Tcf-4 (véase el documento WO 2007/135542). La señalización de beta-catenina/Tcf-4 hace que las células proliferen. En ausencia de esta señalización, se diferencian y experimentan un ciclo celular normal, incluida la muerte celular programada, o apoptosis. Hollande *et al.* han demostrado también que exponiendo dichas células a anticuerpos anti-hPG se bloquea la proliferación inducida por beta-catenina/Tcf-4 y que se inhibe el crecimiento o la proliferación de células CRC (véase, por ejemplo, el documento WO 2007/135542). Las células que proliferan en respuesta al tratamiento con, o a la exposición a, progastrina, ya sea producidas endógenamente o exógenas, y en las que la proliferación se inhibe después del tratamiento con, o la exposición a, anticuerpos anti-PG, se denominan en la presente memoria "sensibles a progastrina".

Como se ha indicado anteriormente, se ha descubierto que las células tumorales, tanto primarias como metastásicas, son sensibles a progastrina, y responden al tratamiento con, o a la exposición a, anticuerpos anti-PG. Aunque sin pretender vincularse a ninguna teoría de operación, se cree que los anticuerpos anti-PG ejercen sus propiedades antiproliferativas uniéndose a PG y bloqueando su interacción con su receptor putativo, inhibiendo a su vez la proliferación inducida por beta-catenina/Tcf-4 que es consecuencia de la expresión aumentada de ICAT. También son posibles otros mecanismos por lo que los anticuerpos anti-PG pueden interferir con la supervivencia y/o el crecimiento de células del cáncer primarias y/o metastásicas.

1.5 Procedimientos terapéuticos

En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para tratar a un sujeto que padece, o al que se ha diagnosticado, cáncer pancreático. Los procedimientos implican la administración al sujeto de una cantidad de uno o más anticuerpos anti-PG eficaces para proporcionar un beneficio terapéutico. Los anticuerpos anti-PG en general, y los anticuerpos anti-PG específicos útiles en los procedimientos, se describen en detalle en una sección posterior.

El sujeto tratado puede ser cualquier animal, por ejemplo un mamífero, tal como un animal de granja (por ejemplo una vaca, un cerdo, un caballo, etc.) o una mascota doméstica (por ejemplo un perro, un gato, etc.) o un ser humano. El anticuerpo anti-PG administrado deberá ser específico para la especie animal que se va a tratar. Para el tratamiento de sujetos humanos, el o los anticuerpos anti-PG deberán unirse específicamente a progastrina humana (en la presente memoria se denominan "anticuerpos anti-hPG", que se describen con mayor detalle a continuación).

El cáncer pancreático que se está tratado puede encontrarse en cualquier estadio de desarrollo, desde el estadio 0 al estadio I, estadio II, estadio III o incluso el estadio IV. De hecho, una ventaja significativa del tratamiento anti-PG descrito en la presente memoria es que se espera que sea eficaz frente a tumores pancreáticos metastásicos, así como frente a tumores pancreáticos primarios, proporcionando de esta forma un beneficio para pacientes que tienen cáncer pancreático incluso en estadios avanzados de desarrollo. Se espera también prevenir la recurrencia del cáncer pancreático.

El tratamiento anti-PG puede utilizarse solo, como monoterapia, o en combinación con, o además de, otros tratamientos que se utilizan habitualmente para tratar el estadio particular del cáncer pancreático. Dichos tratamientos habituales se han indicado anteriormente e incluyen quimioterapia con, por ejemplo gemcitabina, 5-FU u otros agentes quimioterápicos, y tratamientos dirigidos, tales como tratamiento con bevacizumab. En una forma de realización específica, el tratamiento anti-PG se aplica en combinación con, o además de, tratamiento con otros anticuerpos dirigidos a células tumorales, tales como bevacizumab. Cuando se utiliza en combinación con otros tratamientos, el o los anticuerpos anti-PG y otro tratamiento pueden administrarse simultáneamente, sucesivamente o por separado.

Tal como se utiliza en la presente memoria, se dice que un anticuerpo anti-hPG y un segundo agente terapéutico se administran sucesivamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva puede tener lugar con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más horas de diferencia. Por el contrario, se dice que el anticuerpo anti-PG y un segundo agente terapéutico se administran por separado si se administran a un paciente en días diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente terapéutico pueden administrarse a intervalos de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, una semana, 2 semanas o mensuales. La administración del anticuerpo anti-PG puede preceder o ser posterior a la administración del segundo agente terapéutico.

Como alternativa, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente terapéutico pueden administrarse concurrentemente durante un periodo de tiempo, seguido por un segundo periodo de tiempo en el que la administración del anticuerpo anti-PG y el segundo agente terapéutico se alternan.

De forma similar, el anticuerpo anti-PG puede administrarse en combinación con, o además de, extirpación quirúrgica del tumor o de los tumores, si fuera posible. El o los anticuerpos anti-PG pueden administrarse antes, durante o después de la extirpación del tumor.

1.6 Composiciones farmacéuticas

El o los anticuerpos anti-PG se administrarán normalmente en forma de formulaciones o composiciones farmacéuticas. Dichas formulaciones o composiciones pueden incluir opcionalmente agentes activos y/o terapéuticos adicionales, como se sabe en la técnica. Las formulaciones incluirán normalmente un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos, excipientes y/o diluyentes específicos utilizados dependerán del modo de administración deseado. La composición puede encontrarse en cualquier forma adecuada en función del procedimiento de administración deseado a un paciente.

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 de 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 de administración más adecuada en cualquier caso dado dependerá del anticuerpo particular, del sujeto y del estadio del cáncer pancreático que se está tratando.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unidad que contienen una cantidad predeterminada de un anticuerpo anti-PG 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.

Las composiciones farmacéuticas 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 deberán 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. 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), 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 (enumerados 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, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluidos ciclitoles 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, sucrosa 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 para 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 plurónicos, polioxi-etilen-sorbitan-

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.

1.7 Dosis eficaces

Los anticuerpos anti-PG se administran al sujeto en una cantidad suficiente o eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. En el contexto de tratamiento de cáncer pancreático primario y/o metastásico, un beneficio terapéutico puede inferirse si se logran uno o más de los puntos siguientes: detener o ralentizar el crecimiento de tumores, reducir las cantidades y/o los tamaños de tumores dentro de un paciente, encoger tumores no operables a un tamaño y a una ubicación en la que puedan extirparse quirúrgicamente, aumentar la esperanza de vida y/o mejorar la calidad de vida del paciente.

No se requiere una cura completa, aunque es deseable, para que exista un beneficio terapéutico. De hecho, dado que la mediana de supervivencia desde el diagnóstico de cáncer pancreático es de solo 3-6 meses ((Stathis y Moore, 2010, Nat Rev Clin Oncol. 7(3):163-72)), un aumento en la supervivencia de un individuo de un periodo de 3 meses adicionales a esta mediana proporciona un beneficio terapéutico considerable. Véase, por ejemplo, Philip *et al.*, 2009, J. Clin. Oncol. 24(33):5660-5669.

En algunos contextos, el beneficio terapéutico puede correlacionarse con uno o más puntos finales sustitutivos, según los conocimientos de un experto en la materia. A modo de ejemplo y no de limitación, las concentraciones de PG en plasma y/o suero pueden medirse en un sujeto a lo largo del tiempo, siendo una reducción en los niveles de PG, o un nivel inferior a un nivel umbral, por ejemplo, inferior a 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM o 5 pM, indicativo de beneficio terapéutico.

El tamaño, la cantidad y el metabolismo de los tumores 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.

La unión de toda la PG libre no se requiere para lograr una eficacia terapéutica, aunque puede ser deseable. PG libre significa la PG que está disponible para unirse a un anticuerpo anti-PG. Más bien, la reducción de la concentración de PG libre dentro o alrededor de tumores, sistémicamente, en fluidos corporales particulares, o cualquier otra, a una medida más limitada también puede ser eficaz. Los tejidos y los fluidos corporales ejemplificativos en los que puede reducirse la concentración de PG libre mediante la administración de la composición de anticuerpo o de anticuerpos anti-PG incluyen, pero sin limitación, muestras de tumores extirpados a un paciente, líquido ascítico, líquidos de derrames pleurales, líquido cefalorraquídeo, linfa, sangre, plasma, suero, etc. La concentración de PG en uno o más de estos tejidos o fluidos corporales puede cuantificarse utilizando una técnica de ELISA u otras técnicas familiares para los expertos en la materia.

De acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia, la dosis de un anticuerpo anti-PG puede valorarse en un paciente con el fin de reducir la concentración de PG 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 PG libre que varíe entre cualquiera de los valores anteriores.

La cantidad de anticuerpo anti-PG administrado dependerá de una diversidad de factores, incluidos el estadio del cáncer pancreático que se está tratando, 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, la sensibilidad del paciente que se está tratando a 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 técnicas convencionales conocidas 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 del anticuerpo anti-PG en sangre o suero en circulación que corresponda a la constante de afinidad de unión del anticuerpo por la progastrina, 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 modelos animales útiles para analizar la eficacia de agentes para tratar cáncer pancreático son bien conocidos en la técnica. Los expertos pueden adaptar de forma rutinaria dicha información para determinar dosis adecuadas para la 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 la cantidad de anticuerpo anti-PG que sea de saturación, es decir, una cantidad que sea 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 la farmacocinética y la biodisponibilidad, como se sabe en la técnica.

Se espera que la dosis eficaz de una composición de anticuerpos anti-PG varíe 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 dentro del mismo dependiendo del estadio del cáncer pancreático que se está tratando, 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 seguir administrándose 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-PG 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.

5 1.8 Procedimientos de diagnóstico y de seguimiento de un paciente para determinar una eficacia terapéutica

Como se ha indicado anteriormente, los pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer pancreático primario y/o metastásico tienen niveles de PG elevados en plasma y/o suero. Con respecto a la figura 4, los niveles de referencia de PG en individuos sanos son despreciables, encontrándose normalmente en el límite de detección. Los niveles de PG en plasma y/o suero en sujetos con cáncer pancreático primario y/o metastásico pueden medirse, y son de aproximadamente 50 pM. Sobre la base de esta observación, los niveles de PG en plasma y/o suero pueden utilizarse para ayudar a elaborar un diagnóstico de, o realizar un seguimiento de la eficacia de tratamientos de, cáncer pancreático primario o metastásico.

En consecuencia, la presente divulgación también proporciona procedimientos para diagnosticar, o realizar un seguimiento de la eficacia de un transcurso de tratamiento de, cáncer pancreático primario o metastásico. Para ayudar a elaborar el diagnóstico, el nivel de PG de una muestra de plasma o suero de un individuo que se está diagnosticando puede medirse y compararse con un valor umbral, siendo un nivel superior al umbral indicativo de cáncer pancreático, especialmente cuando otros ensayos de diagnóstico indican que el individuo padece cáncer pancreático. En algunas formas de realización, una concentración de PG en plasma o suero de por lo menos aproximadamente 50 pM es indicativa de cáncer pancreático, especialmente cuando se combina con otros resultados de ensayo positivos.

A fin de realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento, pueden medirse niveles de PG en sangre, plasma o suero en puntos temporales específicos. Una reducción de la concentración con respecto al tiempo y/o un nivel medido inferior a un valor umbral en un punto temporal particular son indicativos de eficacia. El valor umbral puede ser el indicado anteriormente, o puede ser un valor específico del sujeto obtenido del sujeto que se está tratando antes de iniciar el tratamiento, o en algún punto temprano durante una ronda de tratamiento.

Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se cree que como las cantidades y/o los tamaños de los tumores en un paciente se reducen como consecuencia de la ronda de tratamiento, la cantidad total de PG producida por los tumores también se reduce. Por el contrario, el que no se produzca ningún cambio sustancial o se produzca un aumento en los niveles de PG después de completar una ronda de tratamiento puede indicar que la terapia no es eficaz. Esta información puede utilizarse por los profesionales de la salud para decidir si debería iniciarse una nueva ronda de tratamiento.

Los niveles de PG pueden medirse utilizando técnicas analíticas familiares para los expertos en la materia, tales como, pero sin limitación, RIA y ELISA. Los anticuerpos anti-hPG útiles para medir niveles de PG en sujetos humanos se describen en una sección posterior.

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 progastrina y un segundo anticuerpo anti-PG dirigido al extremo C de progastrina. Los anticuerpos anti-PG N-terminales y C-terminales ejemplificativos útiles para dicho ensayo 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, operación seguida de un periodo de incubación. A continuación, la superficie se lava y se aplica una solución que contiene un segundo anticuerpo anti-PG "de detección", uniéndose el anticuerpo de detección a un epítipo diferente de la 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). Para este ensayo, los anticuerpos deberán utilizarse en exceso para que toda la PG se una y se cuantifique. Un ensayo tipo sándwich específico para la medición de niveles de PG en plasma y/o suero se proporciona en el Ejemplo 1.

Pueden tomarse múltiples mediciones a intervalos diferentes después de completar el tratamiento y, a continuación, 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.

En una forma de realización que implica una ronda de tratamiento que utiliza un anticuerpo anti-PG, pueden tomarse una o más mediciones durante el transcurso del tratamiento para que pueda estimarse el efecto de los anticuerpos sobre los niveles de PG. En otras de estas formas de realización, cuando hay presencia de anticuerpos anti-PG residuales en un paciente durante la toma de muestra, 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. En otras formas de

realización más, pueden tomarse mediciones postratamiento después de estimar que los anticuerpos anti-PG se han eliminado del paciente de forma que la unión de PG por dichos anticuerpos no afecte a la precisión de la medición de la concentración de PG.

5 Pueden utilizarse diferentes valores de referencia frente a los que se comparan los niveles de PG detectados en un paciente. En algunas formas de realización, el valor de referencia se establece mediante mediciones previas realizadas en el mismo paciente, que pueden tomarse a intervalos predeterminados. En un ejemplo no limitativo, los niveles de PG pueden determinarse semanalmente o mensualmente durante los primeros seis meses después de finalizar un tratamiento, después 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.

15 En otras formas de realización, el valor de referencia puede establecerse a partir de niveles de PG promedio en una población de pacientes con características similares a las del paciente al que se le está realizando el seguimiento. Dichas características pueden incluir, pero no estar necesariamente limitadas a, sexo, edad, tipo de cáncer primario, exposición a determinados tipos de tratamientos, cualquier combinación de las mismas, y otras. En otras formas de realización más, puede utilizarse más de un valor de referencia en el seguimiento de un paciente particular. Por ejemplo, pueden utilizarse un valor de referencia específico del paciente y un valor de referencia derivado de una población.

20 En algunas formas de realización, cuando la concentración de PG promedio en un paciente con cáncer tratado anteriormente se encuentra en el intervalo normal para la población relevante con la que se está comparando al paciente, y permanece estable, el paciente podría clasificarse como que no tiene metástasis y, por lo tanto, no requiere un nuevo tratamiento. Por el contrario, cuando se observa que la concentración de PG aumenta a lo largo de un periodo de tiempo en un paciente con cáncer que se ha tratado anteriormente, y en determinadas formas de realización, supera un umbral derivado de los datos de población, el paciente puede clasificarse como que posiblemente tiene metástasis y, por lo tanto, puede ser candidato a un nuevo tratamiento contra el cáncer metastásico.

30 Debido a que la ingesta de alimento aumenta habitualmente la síntesis y la secreción de gastrina, también puede causar aumentos transitorios en niveles de PG en sangre, que pueden interferir con la medición exacta de niveles de PG en pacientes a los que se les está realizando un seguimiento de la eficacia terapéutica, y de la presencia de metástasis. Para evitar este efecto, en particular cuando debe determinarse la concentración de PG en muestras de sangre, las muestras pueden tomarse de un paciente después de un periodo de ayuno.

35 1.9 Anticuerpos anti-PG

Los anticuerpos útiles en los procedimientos divulgados en la presente memoria son aquellos que se unen específicamente a progastrina humana y no a otros productos del gen de la gastrina. Con referencia a la figura 1, 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.

50 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, medido 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 2.

60 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.

65 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 ejemplificativa 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 ejemplares:

Tabla 1A
Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales

Imunógeno	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 GYIFTSYW (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 TRRDSPOQY (SEC ID nº: 3)		
			V _L CDR 1.3 QSVHSGNNTY (SEC ID nº: 4)	mV _L .3 (SEC ID nº: 13)	hV _L .3 (SEC ID nº: 22)
			V _L CDR 2.3 KVS (SEC ID nº: 5)		
			V _L CDR 3.3 FQGSHVPFT (SEC ID nº: 6)		
N2	20D2C3G2	MAb4	V _H CDR 1.4 GYTFSSSW (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 ATDGNVDWFAY (SEC ID nº: 9)		
			V _L CDR 1.4 QSLVHSSGVTY (SEC ID nº: 10)	mV _L .4 (SEC ID nº: 15)	hV _L .4 (SEC ID nº: 24)
			V _L CDR 2.4 KVS (SEC ID nº: 5)		
			V _L CDR 3.4 SQSTHVPTT (SEC ID nº: 11)		
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb15			
N2	1E9D9B6	MAb16	V _H CDR 1.16 GYFTTSYY (SEC ID nº: 39)	mV _H .16 (SEC ID nº: 61)	hV _H .16a (SEC ID nº: 84)
			V _H CDR 2.16 INPSNGGT (SEC ID nº: 43)		hV _H .16b (SEC ID nº: 86)
			V _H CDR 3.16 TRGGYYPFDY (SEC ID nº: 47)		hV _H .16c (SEC ID nº: 88)
			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)		hV _L .16b (SEC ID nº: 87)
			V _L CDR 3.16 WQGTHTSPYT (SEC ID nº: 57)		hV _L .16c (SEC ID nº: 89)
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)		hV _H .19b (SEC ID nº: 92)
			V _H CDR 3.19 AREVNYGDSYHFDY (SEC ID nº: 48)		hV _H .19c (SEC ID nº: 94)
			V _L CDR 1.19 SQHRTYT (SEC ID nº: 51)	mV _L .19 (SEC ID nº: 66)	hV _L .19a (SEC ID nº: 91)
			V _L CDR 2.19 VKKDGSH (SEC ID nº: 54)		hV _L .19b (SEC ID nº: 93)
			V _L CDR 3.19 GVGDIAIKQSVFV (SEC ID nº: 58)		hV _L .19c (SEC ID nº: 95)
N2	1C11F5E8	MAb20			
Inmunógeno N1 = SWKPPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-BSA; también representado como (SEC ID nº: 25)-Ahx-Cys-BSA;					
Inmunógeno N2 = SWKPPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-KLH; también representado como (SEC ID nº: 25)-Ahx-Cys-KLH					

5 En la tabla 1A, todas las secuencias de aminoácidos se representan utilizando orientación N→C convencional. Para cada inmunógeno, el péptido progastrina 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.

10 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 ejemplificativa 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
15 inmunógenos ejemplares:

Tabla 1B Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales							
Imunógeno	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)
			V _H CDR 2.8	ISSGGTYT	(SEC ID nº: 41)		hV _H .8b (SEC ID nº: 77)
			V _H CDR 3.8	ATQGNYSLDF	(SEC ID nº: 45)		hV _H .8c (SEC ID nº: 79)
			V _L CDR 1.8	KSLRHTKGITF	(SEC ID nº: 49)	mV _L .8 (SEC ID nº: 63)	hV _L .8a (SEC ID nº: 76)
			V _L CDR 2.8	QMS	(SEC ID nº: 52)		hV _L .8b (SEC ID nº: 78)
V _L CDR 3.8	AQNLELPLT	(SEC ID nº: 55)		hV _L .8c (SEC ID nº: 76)			
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)
			V _H CDR 2.13	INTFGDRT	(SEC ID nº: 42)		hV _H .13b (SEC ID nº: 82)
			V _H CDR 3.13	ARGTGTY	(SEC ID nº: 46)		
			V _L CDR 1.13	QSLDSDGKTY	(SEC ID nº: 50)	mV _L .13 (SEC ID nº: 64)	hV _L .13a (SEC ID nº: 81)
			V _L CDR 2.13	LVS	(SEC ID nº: 53)		hV _L .13b (SEC ID nº: 83)
			V _L CDR 3.13	WQGTTFPQT	(SEC ID nº: 56)		
C1	2H9F4B7	MAb14					
C2	1F11F5E10	MAb21					
C2	1F11F5G9	MAb22					
C2	1A11F2C9	MAb23					
Imunógeno C1 = KLH-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEYGMDFGRRSAEDEN, también representado como KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 27)							
Imunógeno C2 = DT-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEYGMDFGRRSAEDEN, 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 epítodos 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 epítodo putativo y se disponen en una membrana de nitrocelulosa que se sonda después con el anticuerpo de ensayo para determinar la secuencia de epítodo mínima reconocida por el anticuerpo. El barrido de alanina se utiliza para determinar residuos dentro de un epítodo que son críticos para la unión al anticuerpo. Cada residuo dentro de un epítodo 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 epítodos comprenden por lo menos las secuencias siguientes: DAPLG (SEC ID nº: 28), PDAPLG (SEC ID nº: 29), PRSQQP (SEC ID nº: 30), WKPRSQQP (SEC ID nº: 31) o WKPRSQQP DAPLG (SEC ID nº: 32), tal como se muestra en la Tabla 2A, a continuación.

Tabla 2A		
Nº de MAb	Antígeno de péptido PG: SWKPRSQQP DAPLG	SEC ID nº
MAb2	WKPRSQQP DAPLG	32
MAb4	WKPRSQQP DAPLG	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 epítodos comprenden por lo menos las secuencias siguientes: FGRR (SEC ID nº: 33), MDFGR (SEC ID nº: 34), AEDEN (SEC ID nº: 35) y GWMDFGRR (SEC ID nº: 36), como se muestra en la Tabla 2B, a continuación.

Tabla 2B		
Nº de MAb	Antígeno de péptido PG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEC ID nº
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 epítodo revelan que MAb2 y MAb4 anti-hPG se unen al mismo epítodo; MAb1 y MAb3 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítodo; MAb17, MAb18, MAb19 y MAb20 se unen aproximadamente al mismo epítodo; MAb15 y MAb16 se unen aproximadamente al mismo epítodo; MAb5, MAb6, MAb7, MAb9 y MAb12 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítodo y se unen aproximadamente al mismo epítodo que MAb10 anti-hPG; y MAb11 y MAb14 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítodo.

Las formas de realización 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 epítodo 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).

5 Las formas de realización 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).

10 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.

15 Como también se expone 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, pueden neutralizar la actividad biológica de la hPG. Por ejemplo, aunque MAb14 anti-hPG se une a la hPG con una KD aproximadamente 6 pM, no inhibe el crecimiento de células del cáncer colorrectal en un ensayo *in vitro*, mientras que otros anticuerpos monoclonales anti-hPG mostraban una actividad inhibitora significativa (véase, por ejemplo, el Ejemplo 7 de la solicitud '329). Aunque tanto los anticuerpos no neutralizantes como los neutralizantes que se unen específicamente a hPG son
20 útiles para los diversos procedimientos de diagnóstico y de seguimiento descritos en la presente memoria, los anticuerpos anti-hPG útiles para procedimientos terapéuticos deberán mostrar actividad neutralizante.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo anti-hPG neutralizante" es un anticuerpo anti-hPG que proporciona una reducción significativa del número de células BxPC-3 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 para neutralizar hPG se describe en el Ejemplo 3. Aquellos anticuerpos anti-hPG que muestran por lo menos una reducción de aproximadamente el 50% en el número de células vivas en este ensayo se piensa que son especialmente útiles en el tratamiento del cáncer pancreático, aunque se espera que los anticuerpos anti-hPG
30 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 vivas en este ensayo proporcionen beneficios terapéuticos.

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 las solicitudes '329 y '041, la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG no depende del epítipo, dado que anticuerpos monoclonales anti-hPG tanto N-terminales como C-terminales mostraron actividad neutralizante en ensayos con células del cáncer pancreático. 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
40 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 µM. 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 10^0 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 µM ($2,5 \times 10^{-6}$ 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)
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)

Tabla 3	
Anticuerpo monoclonal	Constante de afinidad medida Kd (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 4.

Como se indica en las tablas 1A y 1B, se han identificado diversos anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales y C-terminales. Todos estos anticuerpos son específicos de hPG y, con la excepción de MAb14, muestran toda actividad neutralizante en ensayos con células del cáncer colorrectal. Todos los anticuerpos analizados con células del cáncer pancreático (MAb 8, 13, 16 y 19) mostraron actividad neutralizante. 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 la cadena pesada y la 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 (también conocidas como regiones hipervariables) producidos por hibridomas que se han depositado pueden obtenerse utilizando medios convencionales.

Como es conocido en la técnica, la posición/el límite de aminoácidos que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, en función del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden observarse como posiciones hipervariables híbridas, ya que puede considerarse que estas posiciones están dentro de una región hipervariable bajo una serie de criterios mientras que se considera que están fuera de una región hipervariable bajo una serie diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también pueden encontrarse en regiones hipervariables extendidas. Los anticuerpos anti-PG descritos en la presente memoria pueden contener modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprenden cada uno cuatro regiones

FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina β , conectadas mediante tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha con las regiones FR en el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión diana de anticuerpos (véase Kabat *et al.*, 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md.). Tal como se usa en la presente memoria, la numeración de residuos de aminoácidos de inmunoglobulina se realiza según el sistema de numeración de residuos de aminoácidos de inmunoglobulina de Kabat *et al.*, a menos que se indique lo contrario.

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 o MAb20;
- b) anticuerpos que tienen VL CDR y VH CDR que corresponden en secuencia a las VL CDR y VH 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 QSI V_H SNGNTY (" V_L CDR 1.3"; SEC ID n°: 4), QSLV H SSGVTY (" 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), ATDGNVDWFAY (" 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 (" V_L CDR 1.8"; SEC ID n°: 49) y QSLLDSDGKTY (" V_L 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);

5 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);

10 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

15 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);

20 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

25 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.

30 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.

35 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 US 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 US 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 US n° 5.565.332.

40 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:

45 k) cualquiera de las tres VL CDR y cualquiera de las tres VH CDR divulgadas en la presente memoria;

50 l) 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;

m) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID nº: 23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID nº: 24;

5

n) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID nº: 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 nº: 76 y 78;

10

o) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID nº: 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 nº: 81 y 83;

15

p) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID nº: 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 nº: 85, 87 y 89; y

20

q) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID nº: 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 nº: 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 5.

25

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 un 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.

30

35

40

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 5.

45

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 5, 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%.

50

Los expertos apreciarán que en algunos contextos, por ejemplo, contextos de diagnóstico y de seguimiento, puede ser deseable marcar los anticuerpos anti-PG. Dichas marcas son útiles para la detección y la cuantificación. Las marcas adecuadas son bien conocidas en la técnica, y pueden ser "directas" porque pueden observarse o detectarse directamente (por ejemplo, fluoróforos o radioisótopos) o "indirectas" porque interactúan con otra sustancia que produce una señal observable o detectable (por ejemplo, una enzima que actúa sobre un sustrato para producir una señal detectable, o una molécula de unión tal como biotina que se une a una molécula de estraptividina marcada). Se conocen en la técnica numerosos sistemas de marcado, así como medios para marcar anticuerpos con los mismos, y se contemplan para su utilización en la presente memoria.

55

60

Aunque los diversos anticuerpos anti-hPG útiles en los procedimientos 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 a partir de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión. Los fragmentos, sustitutivos, etc., adecuados incluyen, pero sin limitación,

65

fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, vIgG, scFv y *surrobodyes*. A menos que se especifique lo contrario, el término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente memoria, se pretende que incluya todas las formas de anticuerpos y moléculas sustitutivas "similares a anticuerpos", incluidos anticuerpos monocatenarios, *surrobodyes* y fragmentos de unión. Los anticuerpos que tienen estructuras típicas de anticuerpos de origen natural se denominan en la presente memoria "anticuerpos nativos".

1.10 Procedimientos de producción de anticuerpos anti-PG

Los anticuerpos anti-PG útiles en los procedimientos descritos en la presente memoria pueden obtenerse utilizando procedimientos estándar bien conocidos. Para expresar anticuerpos anti-PG útiles en los procedimientos descritos en la presente memoria, se insertan ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa en vectores de expresión de modo que los genes se unan operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "unido operativamente" se pretende que signifique que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de modo que las secuencias de control transcripcional y traduccional presentes dentro del vector proporcionen su función deseada de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen de forma que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándar (por ejemplo, ligado de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y el vector, o ligado en extremos romos si no hay presencia de sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de la cadena ligera o pesada del anticuerpo anti-PG, el vector de expresión puede portar ya secuencias de la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir las secuencias de VH y VL del anticuerpo anti-PG en genes de anticuerpo de longitud completa consiste en insertarlas en vectores de expresión que codifican ya las regiones constantes de la cadena pesada y las regiones constantes de la cadena ligera, respectivamente, de forma que el segmento VH se una operativamente al segmento o a los segmentos de CH dentro del vector y el segmento de VL se una operativamente al segmento de CL dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de modo que el péptido de señal se una en fase al extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína que no sea inmunoglobulina).

Además de los genes de cadenas del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la divulgación poseen secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadenas del anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" se pretende que incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, por Goeddel; *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseado, etc. Los ejemplos de secuencias reguladoras para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen niveles altos de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tales como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de elementos reguladores víricos y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la patente US nº 5.168.062, por Stinski, la patente US nº 4.510.245, por Bell *et al.* y la patente US nº 4.968.615, por Schaffner *et al.*

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes US nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas ellas por Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos tales como G418, puromicina, blasticidina, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su utilización en células huésped DHFR con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418). Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan a una célula huésped mediante técnicas estándar. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia diversidad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares.

Es posible expresar los anticuerpos descritos en la presente memoria tanto en células huésped procariotas como eucariotas. En determinadas formas de realización, la expresión de anticuerpos se realiza en células eucariotas, por ejemplo, células huésped de mamíferos, para una secreción óptima de un anticuerpo inmunológicamente activo y apropiadamente plegado. Las células huésped de mamífero ejemplificativas para la expresión de anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células DHFR-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, tal como se describe por Kaufman y Sharp, 1982, J. Mol. Biol. 159:601-621) células de mieloma NS0, células COS, células 293 y células SP2/0. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que las células huésped se están cultivando. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando procedimientos de purificación de proteínas estándar. Las células también pueden utilizarse para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones sobre el procedimiento anterior se encuentran dentro del ámbito de la presente divulgación. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique o bien la cadena ligera o bien la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo anti-PG descrito en la presente memoria.

También puede utilizarse tecnología de ADN recombinante para eliminar algo de, o todo, el ADN que codifica cualquiera de las cadenas ligera o pesada, o ambas, que no sea necesario para la unión a PG. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas son también útiles en los procedimientos descritos en la presente memoria.

Para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-PG, la célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Normalmente, los dos vectores contienen cada uno un marcador seleccionable separado. Como alternativa, puede utilizarse un único vector que codifica polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera.

También pueden producirse anticuerpos anti-PG mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). También pueden generarse anticuerpos variantes utilizando una plataforma carente de células ((véase, por ejemplo, Chu *et al.*, 2001, Biochemia N° 2 (Roche Molecular Biologicals)).

Una vez se ha producido un anticuerpo anti-PG mediante expresión recombinante o medios sintéticos, puede purificarse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente mediante afinidad por PG después de la selección de Proteína A o de Proteína G, y en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos anti-PG o fragmentos de unión de los mismos pueden condensarse a secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otra forma en la técnica para facilitar la purificación.

Ejemplos

1.11 Ejemplo 1: 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.

1.12 Ejemplo 2: 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 PG 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.

1.13 Ejemplo 3: 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 del cáncer pancreático BxPC-3 en 6 pocillos de una placa de 6 pocillos, a aproximadamente 150.000 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 5 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 con el número de células al comienzo del periodo de tratamiento, denominado T0.

1.14 Ejemplo 4: 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 la presente memoria como 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.

1.15 Ejemplo 5: Ensayo para evaluar la unión competitiva con un anticuerpo anti-hPG de referencia

5 Puede realizarse un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo de interés (anticuerpo de ensayo) compete por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado de la forma siguiente. Se recubren
10 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
15 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
20 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 fluorogénico 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.

20 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.

25 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 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 compete 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.

35 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.

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

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

45 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.

50 1.16 Ejemplo 6: Concentraciones de progastrina en plasma o suero en pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer pancreático primario o metastásico

Este ejemplo demuestra que los pacientes a los que se ha diagnosticado cáncer pancreático primario o metastásico tienen niveles de progastrina en plasma o suero elevados.

55 1.16.1 Procedimientos

60 Se midieron las concentraciones de progastrina en plasma o suero en individuos sanos, como control, y en pacientes a los que se había diagnosticado cáncer pancreático, de estómago, de esófago, de ovarios o de mama. Las muestras de control sanas (n=104) se obtuvieron de un banco de sangre. De los pacientes implicados en el análisis, 25/32 pacientes con cáncer pancreático tenían enfermedad metastásica, a diez de los cuales se les habían extirpado tumores primarios.

65 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 descrita de forma predictiva más adelante.

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.

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.

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.

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 incuban durante 1 hora a 22°C.

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 incuban 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 incuban durante 5 min a temperatura ambiente en la oscuridad, y después se realiza la lectura en un luminómetro.

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 progastrina en las diversas muestras de pacientes.

1.16.2 Resultados

Las gráficas de caja de la figura 4 muestran un percentil de 25, la mediana y un percentil de 75 de concentraciones de progastrina en plasma o suero de pacientes con cáncer analizados, en comparación con controles sanos. Los trazos indican percentiles de 5 y 95 de concentraciones de progastrina en plasma o suero. Estos datos demuestran que las poblaciones de pacientes que comprenden pacientes con cáncer pancreático primario y metastásico tenían niveles elevados de progastrina en su plasma o su suero en comparación con individuos sanos.

1.17 Ejemplo 7: Expresión del gen de la gastrina en líneas celulares de cáncer pancreático primario y metastásico

Este ejemplo muestra que el gen GAST se expresa en líneas celulares de cáncer pancreático primario y metastásico.

1.17.1 Procedimiento

Las células analizadas eran de las líneas celulares de cáncer pancreático primario BxPC-3 y MIA PaCa-2, y las líneas celulares de cáncer pancreático metastásico Capan 1 y SU.86.86. Después de un periodo de cultivo, las células se volvieron a suspender y se lisaron, y se extrajo el ARNm total utilizando el minikit QIAGEN Rneasy según el protocolo del fabricante. El ARN se transcribió de forma inversa utilizando Superscript II RT (Invitrogen) en presencia del cebador Oligo(dT)15 (Roche Applied Science). Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el

kit Quantifast SYBR Green PCR (Qiagen) y el Eppendorf Mastercycler ep realplex (Eppendorf). Los cebadores para la amplificación génica de GAST y GAPDH se obtuvieron de Sigma Life Science. Cada amplificación PCR se realizó en pocillos por triplicado utilizando las condiciones siguientes: 5 min a 95°C, seguido de un total de 45 ciclos de dos temperaturas (10 s a 95°C y 30 s a 60°C).

1.17.2 Resultados

Los niveles relativos de ARNm de gastrina expresada en las diferentes líneas celulares se indican en la figura 56. Los niveles se normalizaron con respecto a la cantidad de ARNm de GAST expresado en la línea celular del cáncer colorrectal LS174T, que sirve como control positivo, y los datos se expresan con respecto a niveles de expresión en la línea celular LS174T CRC. Todas las líneas celulares de cáncer pancreático expresan ARNm para el gen que codifica la progastrina (GAST).

1.18 Ejemplo 8: Secreción de progastrina por líneas celulares de cáncer pancreático

Este ejemplo demuestra que las líneas celulares de cáncer pancreático segregan progastrina.

1.18.1 Procedimiento

La secreción de progastrina se cuantificó utilizando una técnica de ELISA de tipo sándwich en medio acondicionado obtenido de células pancreáticas cultivadas en cultivo 2D, utilizando el protocolo siguiente. Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² hasta que alcanzaron un 60% de confluencia. El medio se retiró a continuación y las células se enjuagaron una vez con PBS. Las células se cultivaron después en 20 ml de medio M11 (sin rojo fenol) durante 48 h. A continuación el medio se recogió, se centrifugó a 1.000 g durante 5 min para eliminar los desechos celulares y se congeló a -80°C. A continuación las células se tripsinizaron y se contaron.

Para medir la progastrina secretada, el medio congelado se descongeló lentamente sobre hielo, y después se concentró 40 veces a un volumen de 500 µl utilizando concentradores de proteína (Icon Pierce) por centrifugación a 2.500 g durante 45 minutos. La concentración de progastrina se midió después utilizando una técnica ELISA de tipo sándwich.

1.18.2 Resultados

Las concentraciones de progastrina en medio acondicionado por las líneas celulares de cáncer pancreático se indican en la figura 6. Los datos se expresan como concentración de progastrina en pM, por millón de células por 48 horas de cultivo.

1.19 Ejemplo 9: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de células de cáncer pancreático metastásico Capan 1 en cultivo

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos anti-hPG inhiben la proliferación de células de tumores pancreáticos metastásicos.

1.19.1 Procedimientos

Se sembraron células Capan 1 en placas de 6 pocillos (50.000 células/pocillo) y se cultivaron en DMEM que contenía el 20% de suero de carnero fetal durante 8 horas. Las células se privaron de suero durante toda la noche, y partiendo a 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. Los técnicos estaban cegados con respecto a los contenidos de las soluciones de tratamiento.

1.19.2 Resultados

Los resultados, mostrados en la figura 7, se calcularon como el número promedio de células por pocillo al final del experimento menos el número de células sembradas al comienzo del experimento. Los resultados de este experimento demuestran que el MAb3 anti-hPG es eficaz para reducir el crecimiento de células de cáncer pancreático metastásico Capan 1 *in vitro*, en comparación con un anticuerpo de control.

1.20 Ejemplo 10: Efecto inhibitor del tratamiento 2D con anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de células BxPC-3

Este ejemplo demuestra el efecto inhibitor de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de células del cáncer pancreático primario BxPC-3 en cultivo.

1.20.1 Procedimiento

5 Para cada experimento, se sembraron 150.000 células BxPC-3 en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio que contenía el 10% de suero de carnero fetal durante 8 horas. Las células se privaron de suero durante toda la noche, y partiendo desde 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 (P3X63Ag8, ATCC, Ref TIB-9) o con 1 µg/ml de MAb8 anti-hPG como se indica.

10 Se realizó un recuento del número de células vivas de células tratadas tanto con MAb de control como con MAb anti-hPG a las 48 horas. Los recuentos de células al comienzo del tratamiento (T0) se sustrajeron de los recuentos de células de ensayo y de control medidos a 48 horas.

1.20.2 Resultados

15 Los resultados se muestran en la figura 8. Las cantidades de células reales tanto para la muestra de control como de ensayo y el número de células de la muestra de ensayo con respecto al control se proporcionan en la Tabla 4, a continuación:

Tabla 4		
BxPC-3(T0 = 129 944)	Cantidades de células - T0	% de control
MAb de CT	125.056 +/- 13.294	
MAb8 anti-hPG	66.056 +/- 16.971	53%

20 **1.21 Ejemplo 11: Efecto inhibidor de tratamiento 2D con anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de células MIA PaCa-2**

Este ejemplo demuestra el efecto inhibidor de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de células del cáncer pancreático primario MIA PaCa-2 en cultivo.

1.21.1 Procedimiento

25 Para cada experimento, se sembraron 100.000 células MIA PaCa-2 en placas de 6 pocillos y se cultivaron en medio que contenía el 10% de suero de carnero fetal + 2,5% de suero de caballo durante 8 horas. Las células se privaron de suero durante toda la noche, y partiendo desde 24 horas después de la siembra (tiempo T0), las células se trataron cada 12 horas durante 72 horas, en presencia del 0,5% de PanexinH, con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal de control (P3X63Ag8, ATCC, Ref TIB-9) o con 10 µg/ml de MAb8 anti-hPG como se indica. Se realizó un recuento del número de células vivas de células tratadas tanto con MAb de control como con MAb anti-hPG a las 72 horas. Los recuentos de células al comienzo del tratamiento (T0) se sustrajeron de los recuentos de células de ensayo y de control medidos a 72 horas.

1.21.2 Resultados

40 Los resultados del experimento se proporcionan en la figura 9. Las cantidades de células reales tanto para la muestra de control como de ensayo y el número de células de la muestra de ensayo con respecto al control se proporcionan en la Tabla 5, a continuación:

Tabla 5		
MIA PaCa-2 (T0 = 96 333)	Cantidades de células - T0	% de control
MAb de CT	264.900 +/- 11.927	
MAb8 anti-hPG	181.167 +/- 236	68%

45 **1.22 Ejemplo 12: Efecto inhibidor del pretratamiento 2D con un anticuerpo monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento subsiguiente de células de cáncer pancreático como esferas de cáncer en suspensión**

Este ejemplo demuestra el efecto inhibidor que el pretratamiento de células de cáncer pancreático metastásico con un anticuerpo monoclonal anti-progastrina tiene sobre la capacidad subsiguiente de estas células para crecer como esferas de cáncer en condiciones de cultivo de baja adherencia.

1.22.1 Experimento 1: Procedimiento

55 Se sembraron en primer lugar 100.000 células Capan 1/pocillo en placas de 6 pocillos en DMEM con el 20% de FCS, se privaron de suero durante toda la noche y se cultivaron durante 48 horas en DMEM con el 0,5% de Panexin H, en presencia de anticuerpo monoclonal anti-progastrina MAb3 o anticuerpo monoclonal de control

(IgG1 antihumano de control; Calbiochem N° de ref. 411451). Al final del tratamiento, para cada grupo, se plaquearon 500 células/pocillo en ocho pocillos de placas de 24 pocillos de ultrabaja adherencia en 500 µl de medio M11 carente de suero que contenía bFGF y EGF y se cultivaron durante 11 días adicionales sin tratamiento. Al final de este periodo, se tomaron fotografías, se realizó un recuento del número de esferas por pocillo y se midió la superficie de las esferas.

1.22.2 Experimento 1: Resultados

Se tomaron fotos al final del periodo "de lavado" de 11 días, durante el que se cultivaron células Capan 1 en todas las condiciones de tratamiento originales en el mismo medio M11. A continuación, un operador que estaba cegado con respecto a la identidad de todos los pocillos realizó un recuento de las esferas.

Como se muestra en la figura 10, la capacidad de las células de cáncer pancreático Capan 1 para crecer como esferoides en placas de baja adherencia se redujo significativamente por medio del tratamiento de 48 horas anterior con un anticuerpo monoclonal contra progastrina.

1.22.3 Experimento 2: Procedimiento

Se sembraron en primer lugar 150.000 células/pocillo (línea celular de cáncer pancreático metastásico SU.86.86) en placas de 6 pocillos (equipo de cultivo adherente convencional) durante 8 horas en RPMI con el 10% de FCS, se privaron de suero durante toda la noche y se cultivaron durante 48 horas en RPMI con 0,5% de Panexin H, en ausencia o presencia de anticuerpo monoclonal anti-progastrina MAb8, MAb13, MAb16 o MAb19. Al final del tratamiento, para cada grupo, se plaquearon 50 células/pocillo en ocho pocillos de placas de 96 pocillos de ultrabaja adherencia en 100 µl de medio M11 carente de suero que contenía bPGF y EGF y se cultivaron durante 6 días adicionales sin tratamiento. Al final de este periodo, se tomaron fotografías, se realizó el recuento del número de esferas por pocillo y se midió la superficie de las esferas.

1.22.4 Experimento 2: Resultados

Se tomaron fotos al final del periodo "de lavado" de 6 días, durante el que se cultivaron células SU.86.86 en todas las condiciones de tratamiento originales en el mismo medio M11. A continuación, un operador que estaba cegado con respecto a la identidad de todos los pocillos contó las esferas.

Como se muestra en la figura 11, la capacidad de las células de cáncer pancreático SU.86.86 para crecer como esferoides en placas de baja adherencia se redujo significativamente por medio del tratamiento de 48 horas anterior con un anticuerpo monoclonal contra progastrina.

Listado de secuencias

<110> BIOREALITES, S.A.S. et al.

<120> Procedimientos de tratamiento del cáncer pancreático

<130> N.112752

<150> 61/293,612

<151> 2010-01-08

<160> 106

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

40 <400> 5
 Lys Val Ser
 1

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

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

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

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

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

<400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp
 1 5

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

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

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

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

20 <220>
 <223> descripción de 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 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
 40 <213> secuencia artificial

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

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

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

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

55 <400> 12

ES 2 657 246 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 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 secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 246 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

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<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

15

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

<210> 16

<211> 345

<212> ADN

20

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 246 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(345)

5

<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
 ggt 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

10 <210> 17
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

20 <220>
 <221> CDS
 <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

ES 2 657 246 T3

	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 Phe Gln Gly				
		85	90	95	
	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	
	<210> 18				
	<211> 354				
5	<212> ADN				
	<213> secuencia artificial				
	<220>				
10	<223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético				
	<220>				
	<221> CDS				
	<222> (1)..(354)				
15	<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	
	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	
	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	
	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	
	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
	Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr				
		100	105	110	
	ctg gtc act gtc tct gca				354
	Leu Val Thr Val Ser Ala				
		115			
	<210> 19				
	<211> 336				
20	<212> ADN				
	<213> secuencia artificial				
	<220>				
25	<223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético				
	<220>				
	<221> CDS				
	<222> (1)..(336)				

ES 2 657 246 T3

<400> 19

	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 Ser 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

- 5 <211> 80
- <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	
 50 55 60	
10	Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn	
	65 70 75 80	

<210> 21

- <211> 115
- <212> PRT
- 15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 246 T3

<400> 21

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

5 <211> 112

<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

20 <213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 657 246 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

<210> 24

5 <211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <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

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

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

ES 2 657 246 T3

<400> 25
 Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5 10

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

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

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

<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

25 <400> 27
 Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp
 1 5 10 15

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

30 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 28
 Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5

40 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 29
 Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5

50 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 30
 Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
 1 5

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

- <400> 31
 Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
 1 5
- 5 <210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 10 <400> 32
 Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5 10
- 15 <210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 20 <400> 33
 Phe Gly Arg Arg
 1
- 25 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 30 <400> 34
 Met Asp Phe Gly Arg
 1 5
- 35 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 40 <400> 35
 Ala Glu Asp Glu Asn
 1 5
- 45 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 50 <400> 36
 Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg
 1 5
- 55 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
- 60 <220>
 <223> descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- 65 <400> 37
 Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala
 1 5
- 70 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
- 75 <220>
 <223> descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 38
 Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

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

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

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

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

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

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

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

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

35 <400> 41
 Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
 1 5

40 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

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

50 <210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

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

60 <210> 44
 <211> 7

<212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

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

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

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

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

 20 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

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

 30 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> secuencia artificial

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

 40 <400> 47
 Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 48
 <211> 14
 45 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

 50 <400> 48
 Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 49
 55 <211> 11
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

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

<210> 56

10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

15 <223> descripción de secuencia artificial: péptido sintético

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

20 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

25 <220>

<223> descripción de secuencia artificial: péptido sintético

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

30 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>

<223> descripción de secuencia artificial: péptido sintético

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

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

45 <220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

50 <400> 59
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

ES 2 657 246 T3

<400> 61

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

5 <211> 121

<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

15 Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<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

10

<211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<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

25

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<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

<211> 115

10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

15

<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

<210> 67

<211> 351

20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

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

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 67
 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 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

15 <210> 68
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

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

25

ES 2 657 246 T3

<400> 68

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 Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
ggc atg tct tgg gtt cgc cag tct cca gac agg agg ctg gag ttg gtc	144
Gly 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 Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr 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
Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val	
100 105 110	
tcc tca	342
Ser Ser	

<210> 69

- 5 <211> 351
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

<220>

- 10 <223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<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	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
tat atg tac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att	144
Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga gag att aat cct agc aat ggt ggt act aac ttc aat gag aag ttc	192
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gca tac	240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
aca aga ggc ggt tac tac ccc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act	336
Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
100 105 110	
ctc aca gtc tcc tca	351
Leu Thr Val Ser Ser	
115	

ES 2 657 246 T3

<210> 70
 <211> 363
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

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

 10 <220>
 <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
 15 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

 20 25 30
 tat gcc tqg 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

 20 <210> 71
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 25 <223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 30

ES 2 657 246 T3

<400> 71

gac att gtg atg acg cag get 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

5

<210> 72

<211> 336

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

15

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 72

gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgc 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

20

<210> 73

<211> 336

ES 2 657 246 T3

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
5 <223> descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

10

<400> 73
gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg 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 ggc 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 tcg 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

15

<210> 74
<211> 345
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20

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

25

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)

ES 2 657 246 T3

<400> 74

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

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

ES 2 657 246 T3

<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<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

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

<210> 77

<211> 117

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

20 <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

ES 2 657 246 T3

<210> 78
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

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

<400> 78

10

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
    
```

<210> 79
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15

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

20

<400> 79

```

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

ES 2 657 246 T3

<210> 80
 <211> 114
 <212> PRT
 5 <213> secuencia artificial

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

 10 <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

 15 <210> 81
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

 20 <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

ES 2 657 246 T3

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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 82

<211> 114

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <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

<210> 83

15 <211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <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

ES 2 657 246 T3

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

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

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

<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

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

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

ES 2 657 246 T3

<400> 85

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

5 <211> 117

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<900> 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

ES 2 657 246 T3

<400> 87

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

- 5 <210> 88
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

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

<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

- 20 <210> 89
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial

ES 2 657 246 T3

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 89

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

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

<210> 90

<211> 121

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

15 <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

<211> 115

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 657 246 T3

<220>

<223> descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<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

5

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

Glu Ile Lys
115

<210> 92

10 <211> 121

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <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

ES 2 657 246 T3

<210> 93
 <211> 115
 <212> PRT

5 <213> secuencia artificial

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

10 <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

15 <210> 94
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

<400> 94

ES 2 657 246 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 secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa es 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

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

<210> 97
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> secuencia artificial

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

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

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

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

<220>
 <223> descripción de 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
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

<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

60 <400> 100

ES 2 657 246 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 Glu Ala Tyr Gly Trp Met
 20 25 30

Asp Phe

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

25

ES 2 657 246 T3

<400> 103

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

5

<211> 17

<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

10

Phe

<210> 105

<211> 18

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<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

25

<400> 106

Ser Ala Glu Asp Glu Asn
1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-progastrina humana monoclonal para la utilización en el tratamiento del cáncer pancreático en el que el anticuerpo comprende
- 5
- 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
 - 10
 - 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
 - 15
 - 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
 - 20
 - 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;
 - 25
 - 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.
 - 30
 - 35
2. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-progastrina humana se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.
- 40
3. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo presenta una afinidad de unión a progastrina comprendida entre 10^{-6} M y 10^{-12} M.
- 45
4. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el 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
 - 50
 - 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
 - 55
 - 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
 - 60
 - 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.
- 65
5. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es quimérico.

6. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo está humanizado.
7. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo comprende:
- 5 • 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
 - 10 • 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
 - 15 • 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
 - 20 • 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
 - 25 • 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.
8. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el cáncer pancreático es un cáncer pancreático primario.
9. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el cáncer pancreático es un cáncer pancreático metastásico.
- 30 10. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra complementario a la resección quirúrgica del tumor.
- 35 11. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra complementario a la quimioterapia.
- 40 12. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra complementario a la radioterapia para el cáncer pancreático.
- 45 13. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra en combinación con un agente quimioterápico o un segundo anticuerpo terapéutico para el cáncer pancreático.
- 50 14. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo se administra simultáneamente, sucesivamente o por separado con un agente quimioterápico o un segundo anticuerpo terapéutico.
- 55 15. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 13 o 14, en el que dicho agente quimioterápico es gemcitabina o 5-FU.
16. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 13 o 14, en el que dicho segundo anticuerpo terapéutico es el bevacizumab.
17. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se administra a una dosis de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg.
18. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 1, en el que la dosis de dicho anticuerpo se administra durante una pluralidad de administraciones espaciadas temporalmente.

FIG. 1

Preprogastrina: M QRLCVYVLI⁻²¹F ALALAAFSEA⁻¹¹ SWKPRSQQPD⁻¹ APLGTGANRD⁺¹ LELPWLEQQG²¹
PASHHRRQLG³¹ PQGPPHLVAD⁴¹ PSKKQGPWLE⁵¹ EEEEAYGWMD⁶¹ FGRRSAEDEN⁷¹

Progastrina: SWKPRSQQPD⁺¹ APLGTGANRD¹¹ LELPWLEQQG²¹
PASHHRRQLG³¹ PQGPPHLVAD⁴¹ PSKKQGPWLE⁵¹ EEEEAYGWMD⁶¹ FGRRSAEDEN⁷¹

G34: QLG⁴¹ PQGPPHLVAD⁵¹ PSKKQGPWLE⁶¹ EEEEAYGWMD⁷¹ F-NH₂

G34-Gly: QLG⁴¹ PQGPPHLVAD⁵¹ PSKKQGPWLE⁶¹ EEEEAYGWMD⁷¹ FG

G17: QGPWLE⁶¹ EEEEAYGWMD⁷¹ F-NH₂

G17-Gly: QGPWLE⁶¹ EEEEAYGWMD⁷¹ FG

CTFP: SAEEDEN⁷⁵

FIG. 2A

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. 2G

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. 2H

mV_L MAb13

gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgc 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. 2J

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. 2K

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	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	
			20					25							30	
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									

FIG. 2L

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. 3K

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. 3P

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. 3Q

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. 3S

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. 3V

hV_L MAb19(a)

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

FIG. 3Z

hV_L MAb19(c)

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

FIG. 4

Concentración de progastrina en muestras de sangre de pacientes con cáncer pancreático

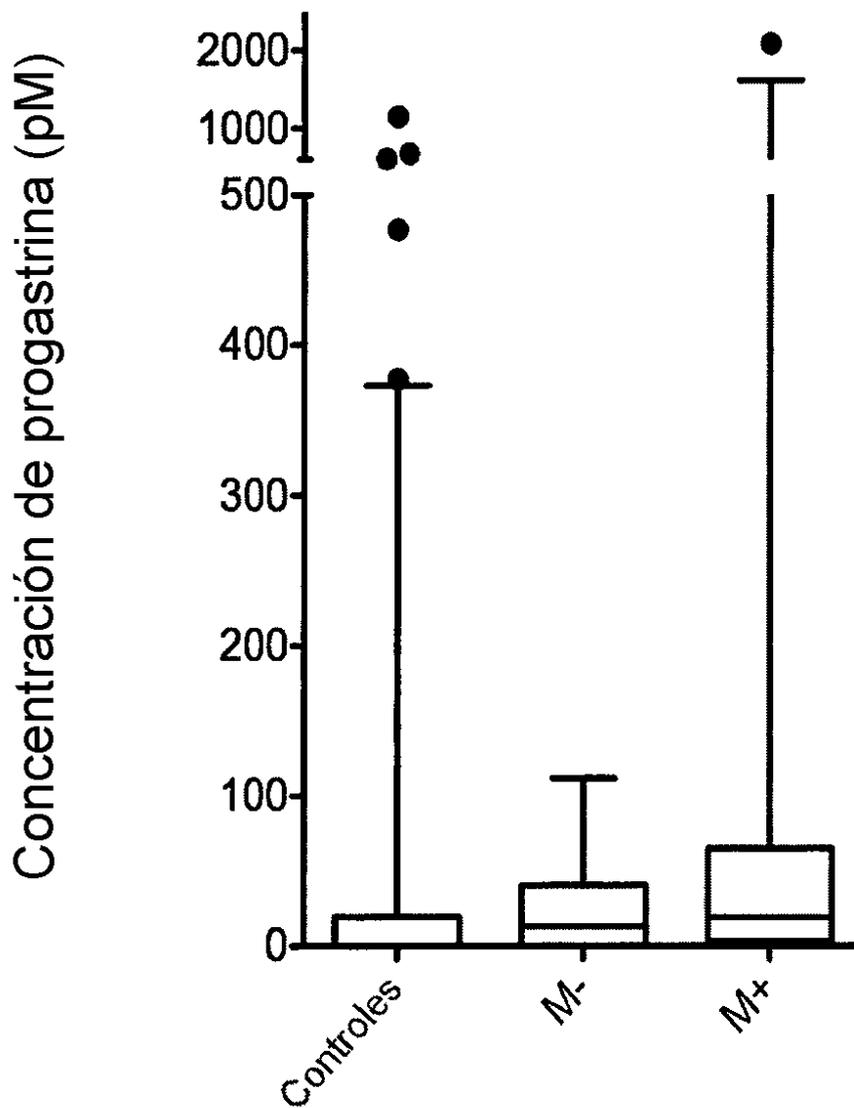


FIG. 5

Expresión de ARNm de GAST
(con respecto a células LS174T)

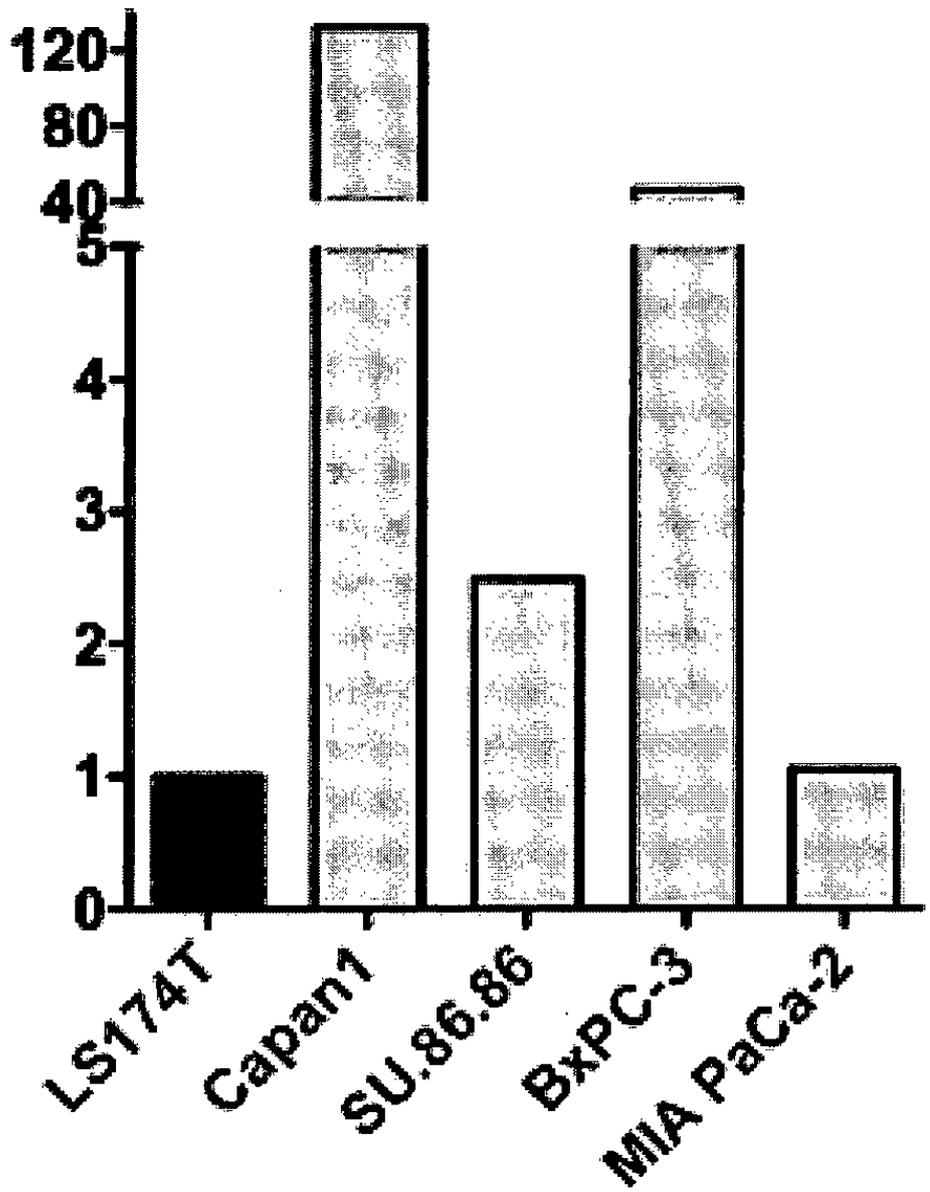


FIG. 6

Secreción de progastina por líneas celulares de cáncer pancreático

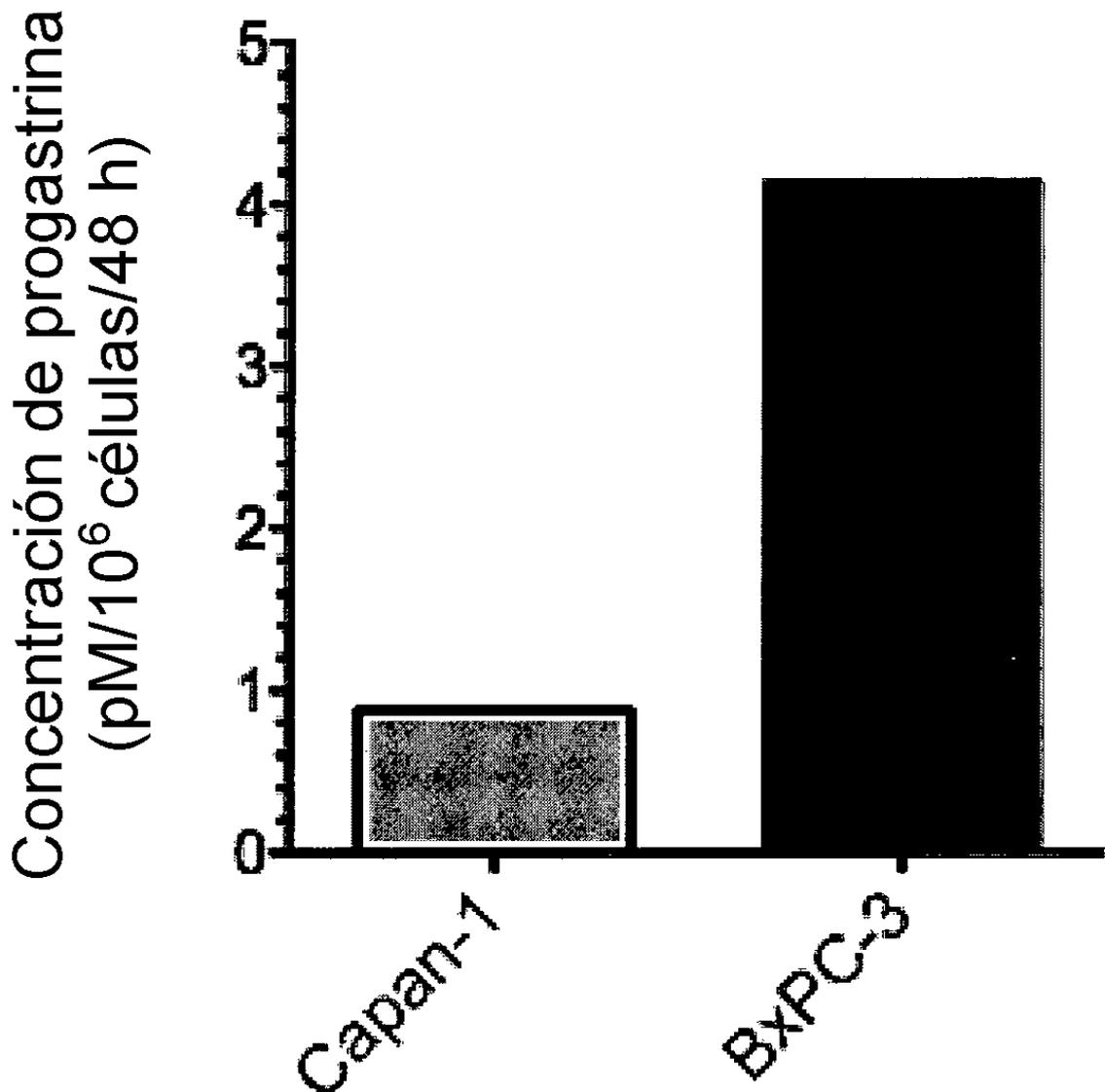


FIG. 7

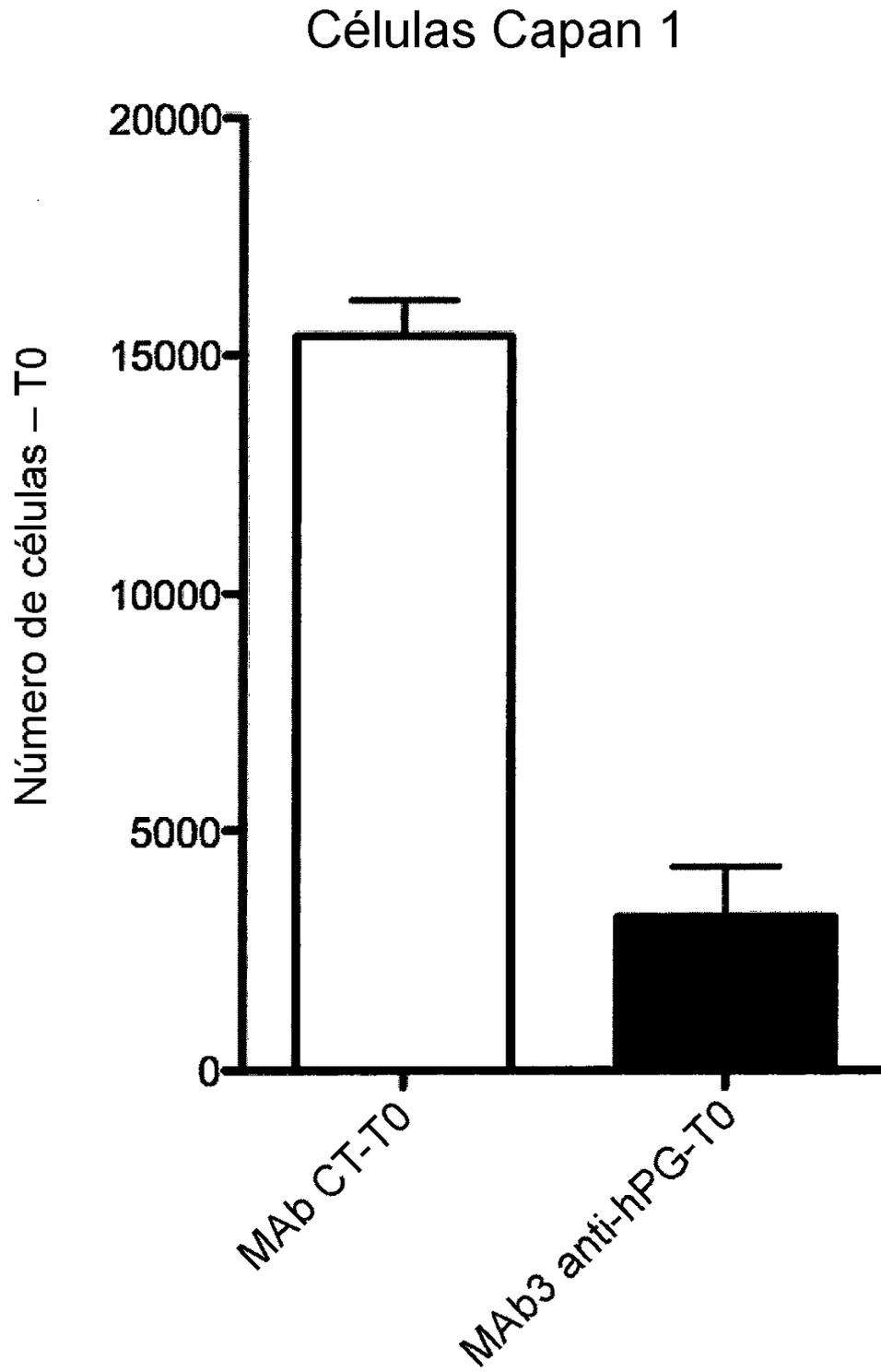


FIG. 8

BXPC-3

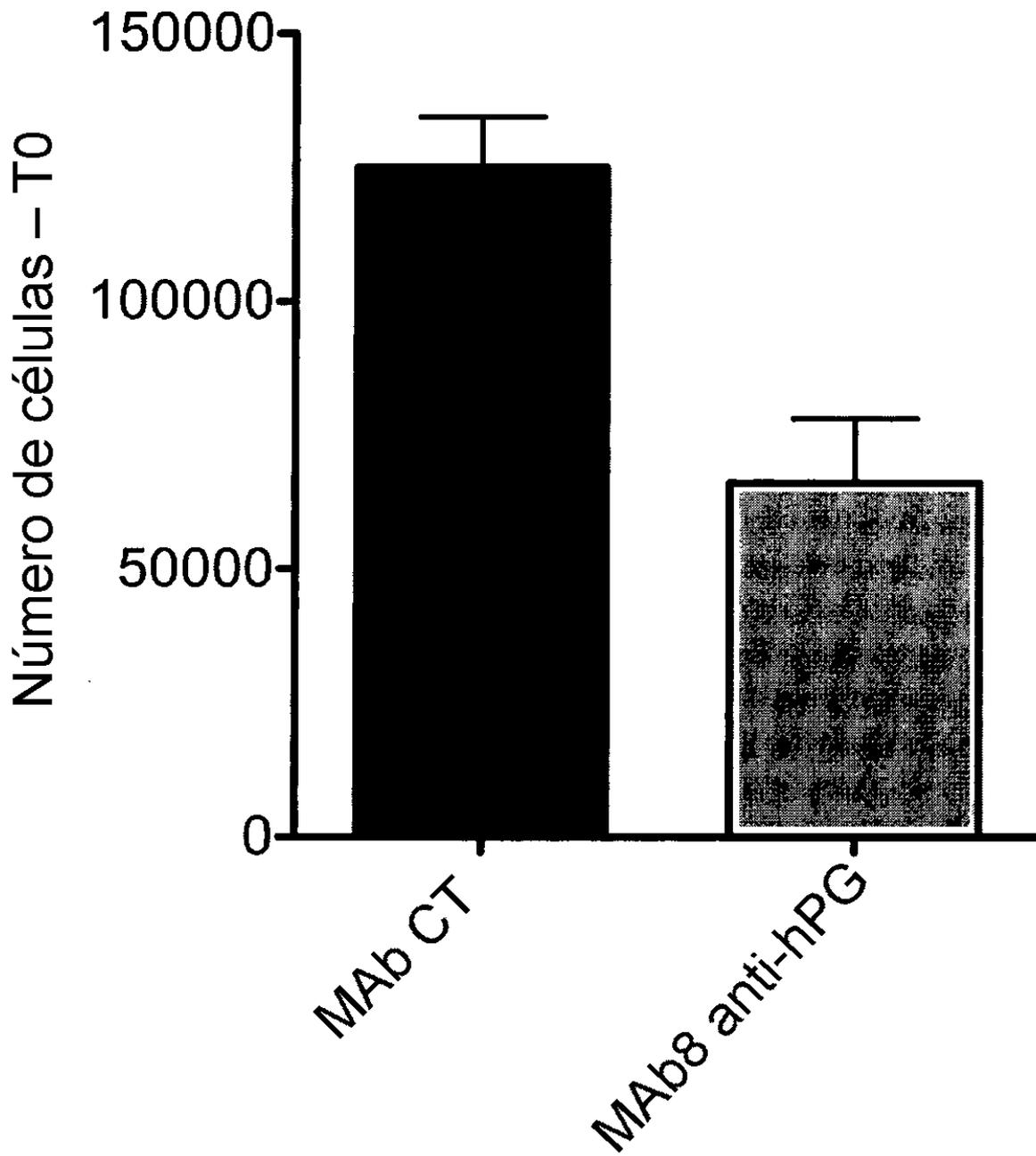


FIG. 9

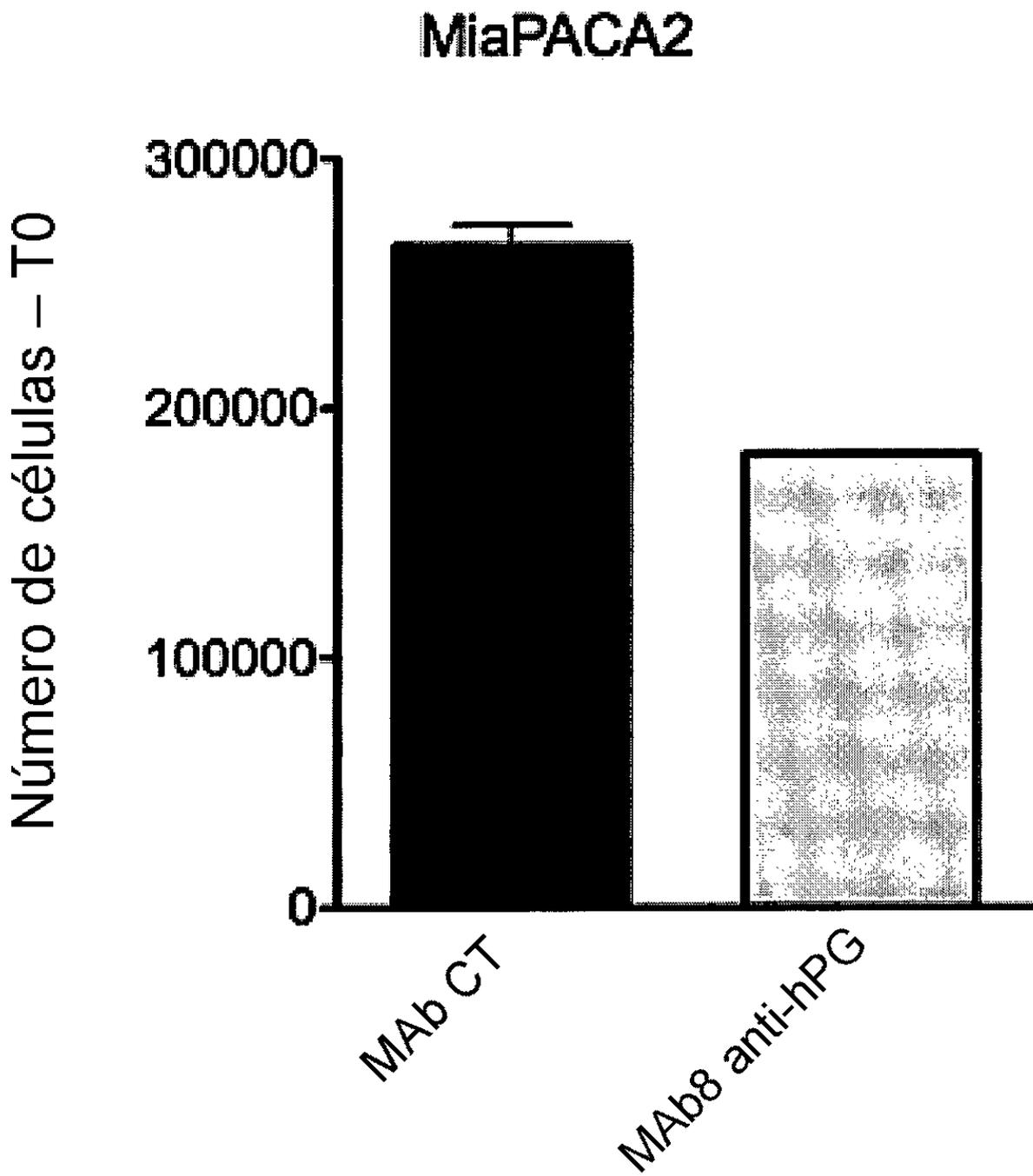
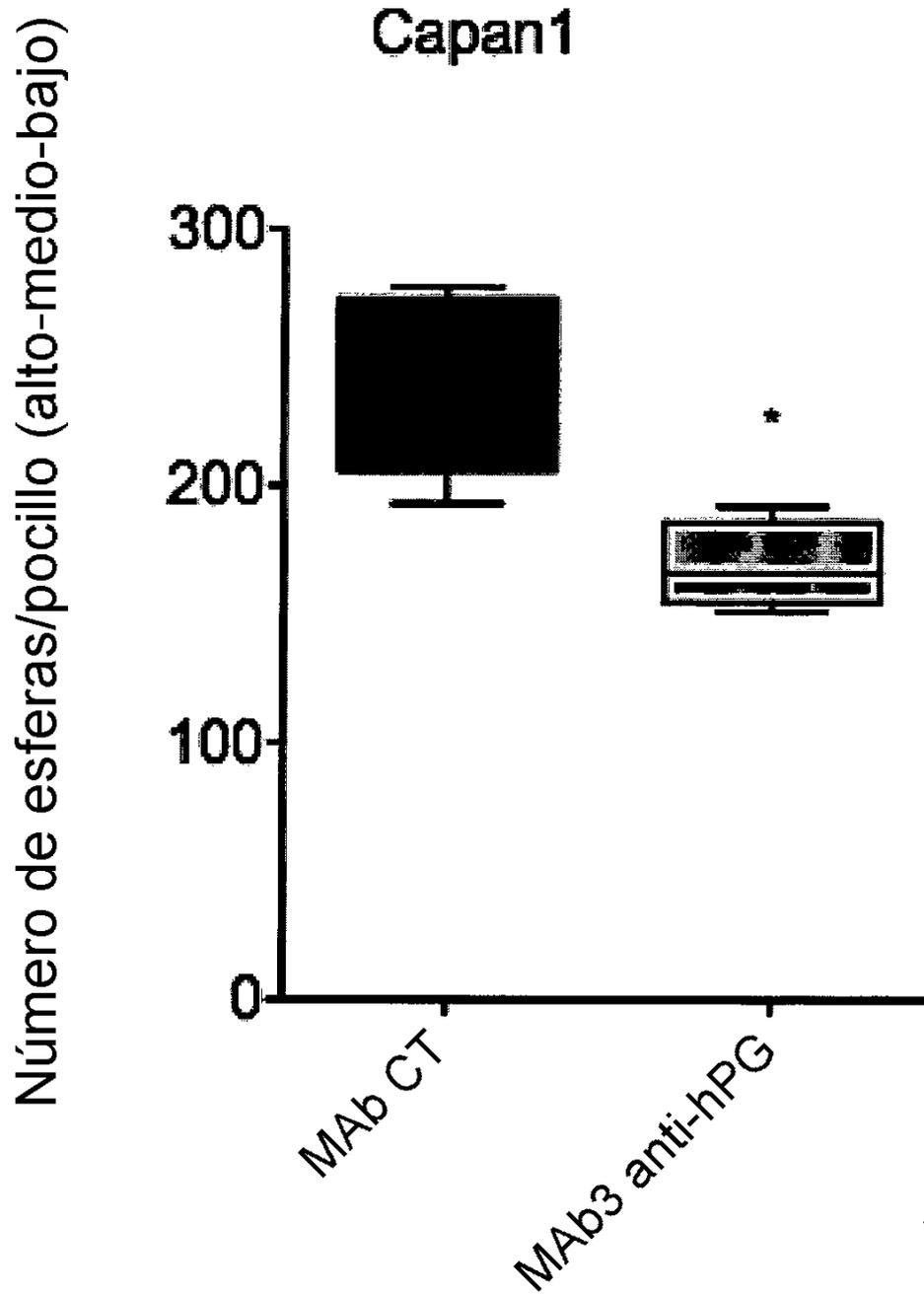
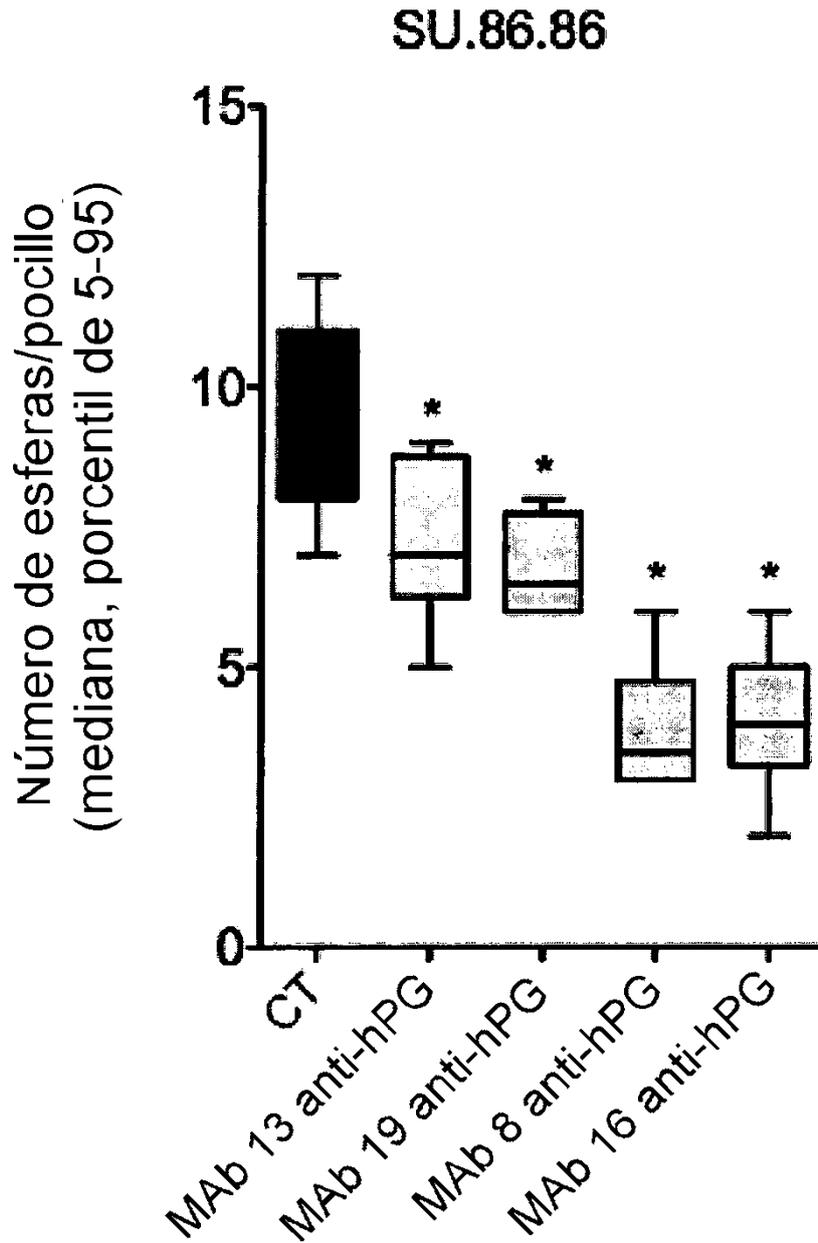


FIG. 10



*,p = 0,0286 frente a MAb CT, ensayo de Mann-Whitney

FIG. 11



*, $p < 0,05$ frente al control, ANOVA de una vía con ensayo de comparación múltiple de Bonferonni