(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 657 458**

(51) Int. CI.:

C07K 16/26 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2011 PCT/EP2011/000046**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11083088**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2011 E 11704178 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2542585**

(54) Título: **Procedimientos para tratar el cáncer colorrectal**

(30) Prioridad:

26.07.2010 US 367855 P
08.01.2010 US 293612 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

PANNEQUIN, JULIE;
HOUHOU, LEÏLA;
FRAMERY, BÉRÉNICE;
ERKILIC, NEJLA;
JOUBERT, DOMINIQUE y
HOLLANDE, FRÉDÉRIC

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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 colorrectal.

Descripción

Campo de la invención

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

Antecedentes

A pesar de décadas de investigación básica y clínica, el cáncer colorrectal continúa siendo una de las enfermedades no transmisibles más mortífera para el ser humano. Según el proyecto GLOBOCAN del Project of the World Health Organization´s International Agency for Research on Cancer, se estimó que en 2008 la incidencia de cáncer colorrectal fue superior a 1,2 millones y que en el mismo año más de 600 mil personas murieron por esta enfermedad. Aunque se ha aprendido mucho recientemente con respecto a cómo actúa el cáncer colorrectal a nivel molecular, los médicos aún confían en modalidades terapéuticas tales como cirugía, radiación y quimioterapia que serían familiares a oncólogos de hace una generación. El diagnóstico precoz, posibilitado por avances en la tecnología de imagenología y en diagnósticos moleculares, es un factor de gran importancia en el éxito de cualquier tratamiento. Aunque la eficacia de todos estos tratamientos ha mejorado a lo largo de los años, la mejora en las tasas de curación y el aumento de la longevidad han sido graduales. Incluso los nuevos tratamientos dirigidos que son consecuencia de la revolución en la oncología molecular tienen, en su mayor parte, resultados mejorados solo modestamente.

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

La metástasis tiene lugar cuando el cáncer colorrectal se extiende a órganos distantes desde el tumor primario. Aunque a menudo es posible extirpar el tumor primario, es la metástasis la que frecuentemente acaba causando la muerte del paciente, debido a que los tumores se vuelven demasiado numerosos o están demasiado entrelazados con tejido huésped sano como para tratarlos quirúrgicamente. Según la American Cancer Society, la tasa de supervivencia de cinco años en los Estados Unidos para pacientes a los que se diagnosticó cáncer colorrectal en el estadio IIIC entre 1998 y 2000 fue del 28%, que se redujo a solo el 6% en el estadio IV (es decir, cáncer colorrectal metastásico).

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

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

Sumario

La presente invención proporciona un anticuerpo para su utilización en el tratamiento, la prevención o la prevención de la recurrencia del cáncer colorrectal metastásico tal como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación proporciona procedimientos útiles para tratar pacientes con necesidad de tratamiento contra el cáncer colorrectal metastásico mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende anticuerpos que se unen específicamente a progastrina. En algunas formas de realización, el cáncer colorrectal metastásico que se va a tratar está ubicado en el hígado, los pulmones, el cerebro o los ganglios linfáticos.

La progastrina está asociada con el cáncer (documento WO 2008/076454; Siddheshwar *et al.*, Gut, 48(1): 47-52, 2001; Singh *et al.*, Cancer Res., 56(18): 4111-4115, 1996; Pannequin *et al.*, Gastroenterology, 133(5): 1554-1568, 2007; Ciccotosto *et al.*, Gastroenterology, 109(4): 1142-11453, 1995; Singh *et al.*, Am. J. Physiol.

Gastrointest. Liver Physiol., 278: G390-G399, 2000; Singh *et al.*, Cancer Res, 8 de octubre de 2014, 67 (suplemento 9) 3546-3546; Singh *et al.*, Gastroenterology, 119(11): 162-171, 2000.). El documento WO 2007/135542 divulga un procedimiento para tratar y/o prevenir el cáncer colorrectal, la poliposis adenomatosa o la metástasis producida por células que segregan progastrina utilizando anticuerpos anti-progastrina policlonales. Se ha informado de anticuerpos monoclonales contra progastrina, aunque no está claro si estos anticuerpos realmente se unen a la progastrina (documento WO 2006/032980). Los tratamientos del cáncer con anticuerpos son conocidos en la técnica (Hecht *et al.*, American Journal of Health-System Pharmacy, junio de 2008, 65 (11 suplemento 4) S15-S21; Tamiya *et al.*, J. Clin. Oncol., 14(6): 513-517, 2009; Jean y Shah, Pharmacotherapy, 28(6):742-754, 2008; Petkova *et al.*, Int Immunol, 18 (12): 1759-1769, 2006; documento US 2001/039017, documento WO 2009/0099649, documento US 2009/275546, documento WO 2004/090547).

En algunas otras formas de realización, es útil tratar a un paciente mediante la administración de una composición de anticuerpos anti-progastrina antes de la extirpación quirúrgica del cáncer colorrectal metastásico. En otras formas de realización, es útil tratar dichos pacientes mediante la administración de la composición de anticuerpos después de la extirpación quirúrgica de dichos tumores.

En algunas formas de realización, es útil tratar a un paciente mediante la administración de una composición de anticuerpos anti-progastrina antes de administrar radioterapia al paciente. En otras formas de realización, es útil tratar dichos pacientes mediante la administración de la composición de anticuerpos después de la radioterapia.

En algunas otras formas de realización, es útil tratar a un paciente mediante la administración de una composición de anticuerpos anti-progastrina antes, concurrentemente o después de un agente quimioterápico. Los agentes quimioterápicos útiles para este fin incluyen, pero sin limitación, antagonistas de folato, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, agentes alquilantes de ADN, fármacos reticulantes de ADN, antibióticos, complejos de platino, inhibidores de proteosoma, venenos del huso mitótico, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la tirosina cinasa, etc.

En algunas formas de realización, es útil tratar a un paciente mediante la administración de una composición de anticuerpos anti-progastrina antes, concurrentemente o después de un tipo diferente de anticuerpos con eficacia contra el cáncer colorrectal metastásico. Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos dirigidos a EGFR, tales como cetuximab o panitumumab, y anticuerpos dirigidos a VEGF, tales como bevacizumab.

Para su utilización en los procedimientos de tratamiento del cáncer colorrectal metastásico, los anticuerpos terapéuticos pueden ser eficaces para reducir la proliferación o aumentar la diferenciación o la tasa de muerte celular de células del cáncer colorrectal metastásico, reducir el número o el tamaño promedio de metástasis colorrectales o reducir la concentración en sangre de progastrina en pacientes tratados.

Las composiciones de anticuerpos para su utilización en los procedimientos de la divulgación pueden prepararse en forma de diferentes formulaciones, que incluyen, pero sin limitación, una suspensión acuosa, para su administración a través de una diversidad de vías, incluidas, pero sin limitación, administración parenteral, administración intratecal, administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraperitoneal, administración por infusión o administración en embolada. En algunas formas de realización, la composición se formula para su administración parenteral, y en algunas formas de realización específicas, para inyección intravenosa por infusión.

En algunas formas de realización, una dosis eficaz de los anticuerpos anti-progastrina de la divulgación varía de 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg, que puede administrarse en una administración, o a lo largo de múltiples administraciones espaciadas.

La divulgación también proporciona kits farmacéuticos para su utilización por médicos y otros profesionales para facilitar la administración de composiciones de anticuerpos anti-progastrina a pacientes. En algunas formas de realización, los kits incluyen un anticuerpo anti-progastrina de la divulgación, o bien en forma liofilizada o bien como solución acuosa, un diluyente, tal como agua de grado farmacéutico o un tampón, y un dispositivo de administración del anticuerpo anti-progastrina, tal como una jeringa y una aguja. En otras formas de realización, los kits pueden incluir adicionalmente un segundo agente terapéutico, tal como, pero sin limitación, los agentes quimioterápicos de la divulgación, un segundo anticuerpo anti-progastrina de la divulgación, o cualquier otro.

También se proporcionan procedimientos para prevenir el cáncer colorrectal metastásico mediante la administración a un paciente con necesidad de prevención de cáncer colorrectal metastásico de una composición que comprende un anticuerpo que se une específicamente a progastrina en una cantidad eficaz para prevenir el cáncer colorrectal metastásico. En una serie de formas de realización, los anticuerpos de la composición son eficaces para reducir la proliferación o aumentar la diferenciación o la tasa de muerte celular de células del cáncer colorrectal metastásico, o reducir la concentración de progastrina en sangre en pacientes tratados.

En algunas formas de realización, la composición puede administrarse antes o después de cirugía o radioterapia contra el cáncer colorrectal primario, o concurrentemente o después de la administración de un agente

quimioterápico eficaz para prevenir el cáncer colorrectal metastásico. La composición también puede administrarse concurrentemente o después de un segundo anticuerpo terapéutico eficaz para prevenir el cáncer colorrectal metastásico que tiene especificidad por sustancias diferentes a la progastrina.

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

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

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

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

También se proporcionan procedimientos para realizar un seguimiento de la eficacia de un tratamiento contra el cáncer colorrectal metastásico en un paciente, tal como quimioterapia, tratamiento biológico, inmunoterapia o tratamiento con anticuerpos, determinando la concentración de progastrina en una primera muestra, tal como un fluido corporal o una biopsia de cáncer colorrectal metastásico, obtenida de un paciente antes de un tratamiento contra el cáncer colorrectal metastásico, y después comparando la concentración de progastrina en la primera muestra con la de una segunda muestra obtenida del mismo paciente después del tratamiento, indicando una reducción en la concentración de progastrina en dicha segunda muestra en comparación con dicha primera muestra que el tratamiento ha sido eficaz.

En algunas formas de realización del procedimiento se utiliza un ensayo, tal como RIA o ELISA, que utiliza un anticuerpo específico para progastrina para determinar la concentración de progastrina en la primera y la segunda muestra.

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

En algunas formas de realización del procedimiento, el paciente se trató previamente de cáncer colorrectal y se encuentra en remisión en el momento de obtener la muestra. En otras formas de realización, el procedimiento incluye la etapa adicional de forma de realización de una segunda prueba de diagnóstico en el paciente para confirmar la presencia de cáncer colorrectal que incluye, por ejemplo, un análisis de sangre, una prueba imagenológica médica o un estudio genético. En algunas formas de realización, el análisis de sangre se realiza para detectar un antígeno carcinoembrionario y en otras formas de realización el estudio genético se realiza para detectar mutaciones en el gen de APC (adenomatous polyposis coli). En otras formas de realización más, se utiliza un ensayo tal como RIA o ELISA que utiliza un anticuerpo específico para progastrina para determinar la concentración de progastrina en la muestra.

Muchos tipos diferentes de anticuerpos que se unen específicamente a progastrina pueden ser eficaces para tratar el cáncer colorrectal metastásico. Estos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, que pueden estar humanizados, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos que tienen los isotipos de IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM, y anticuerpo monocatenarios. En algunas otras

formas de realización, los anticuerpos útiles para los procedimientos de la divulgación incluyen anticuerpos conjugados a restos que modifican positivamente su función o sus características, por ejemplo, pero sin limitación, aumentando su semivida en suero. En otras formas de realización más, pueden efectuarse cambios de aminoácidos con un fin similar, o con otros fines.

En algunas formas de realización, los anticuerpos reconocen solo un epítopo de progastrina. En otras formas de realización pueden utilizarse mezclas de anticuerpos específicos para diferentes epítopos de progastrina.

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

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

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

Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona un gráfico que compara niveles de expresión del gen de la gastrina entre diferentes estirpes celulares del cáncer colorrectal primario y metastásico humanas.

La figura 2 proporciona un gráfico que compara los niveles de expresión de gen de la gastrina relativos en tumores colorrectales metastásicos de cada uno de 11 pacientes diferentes. Los niveles de expresión en el tumor o los tumores colorrectales metastásicos para cada paciente se normalizaron al nivel de expresión en el tumor colorrectal primario correspondiente del mismo paciente.

La figura 3 proporciona un gráfico que compara la cantidad de progastrina segregada en el medio de cultivo por tres estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico diferentes.

La figura 4 proporciona un gráfico que muestra concentraciones de progastrina en plasma o suero en pacientes con cáncer colorrectal primario, cáncer colorrectal metastásico y cáncer colorrectal metastásico de pacientes a los que se ha extirpado el tumor primario, en comparación con controles sanos.

La figura 5 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos policlonales de control y anti-hPG sobre el crecimiento de células del cáncer colorrectal metastásico SW620 en cultivo.

La figura 6A proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos policlonales de control y cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG (MAb1-MAb4) sobre el crecimiento de células del cáncer colorrectal metastásico SW620 en cultivo.

La figura 6B proporciona un gráfico que compara el efecto sobre el crecimiento de células del cáncer colorrectal metastásico SW620 en cultivo de tratamiento con 19 anticuerpos monoclonales anti-hPG diferentes (MAb5-MAb23) en comparación con un anticuerpo de control.

La figura 7 proporciona un gráfico que compara el efecto de anticuerpos monoclonales de control y anti-hPG sobre el crecimiento de células del cáncer colorrectal metastásico T84 en cultivo.

La figura 8A proporciona una fotografía de un hígado en el que hay presencia de metástasis no visibles extirpadas de un ratón atímico tratado con anticuerpos policlonales anti-hPG. Se inyectaron células SW620 en el bazo de los ratones atímicos, y después se trataron durante seis semanas con anticuerpos policlonales

anti-hPG, un anticuerpo policlonal de control o solución salina tamponada con fosfato.

La figura 8B proporciona fotografías de hígados con metástasis visibles extirpadas de un ratón atímico tratado con un anticuerpo policlonal de control. Se inyectaron células SW620 en el bazo de los ratones atímicos, y después se trataron durante seis semanas con anticuerpos policlonales anti-hPG, un anticuerpo policlonal de control o solución salina tamponada con fosfato.

La figura 9 proporciona un gráfico que compara el número de metástasis de hígado visibles formadas después de inyectar células SW620 en el bazo de los ratones atímicos y, a continuación, tratarlos durante seis semanas con anticuerpos policlonales anti-hPG, un anticuerpo policlonal de control o solución salina tamponada con fosfato.

La figura 10 proporciona una fotomicrografía de una micrometástasis de hígado ejemplificativa formada después de inyectar células SW620 en el bazo de los ratones atímicos y, a continuación, tratarlos durante seis semanas con anticuerpos policlonales de control o solución salina tamponada con fosfato.

La figura 11 proporciona un gráfico que compara el número de metástasis de hígado visibles formadas después de inyectar células SW620 en el bazo de los ratones atímicos y, a continuación, tratarlos durante seis semanas con anticuerpos monoclonales anti-hPG frente a un anticuerpo de control.

La figura 12 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del cultivo en condiciones de cultivo de baja adherencia sobre la expresión del marcador de células madre LGR5 de estirpes celulares de cáncer colorrectal primario y metastásico, así como de células obtenidas de una muestra de biopsia de cáncer colorrectal humano primario.

La figura 13 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del cultivo en condiciones de cultivo de baja adherencia sobre la cantidad ARNm de gastrina expresada por estirpes celulares de cáncer colorrectal primario y metastásico, así como por células obtenidas de una muestra de biopsia de cáncer colorrectal humano primario.

La figura 14 proporciona un gráfico que muestra la cantidad de progastrina segregada en el medio por estirpes celulares de cáncer colorrectal primario y metastásico, así como por células obtenidas de una muestra de biopsia de cáncer colorrectal humano primario, cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 15 proporciona un gráfico que demuestra el efecto de anticuerpos policlonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal primario HT-29 cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 16 proporciona un gráfico que demuestra el efecto de anticuerpos policlonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal primario HCT116 cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 17 proporciona un gráfico que demuestra el efecto de anticuerpos policlonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células obtenidas de una muestra de biopsia de cáncer colorrectal humano primario cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 18A proporciona un gráfico que demuestra el efecto de dos anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal primario HT29 positivas a LGR5 incubadas en condiciones de cultivo de baja adherencia a lo largo de 14 días.

La figura 18B proporciona un gráfico que demuestra que el efecto inhibidor del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación de esferas por células del cáncer colorrectal primario HT29 positivas a LGR5 en cultivo de baja adherencia continúa durante por lo menos 17 días después de retirar los anticuerpos.

La figura 19A proporciona un gráfico que demuestra el efecto de dos anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal primario HCT116 positivas a LGR5 incubadas en condiciones de cultivo de baja adherencia a lo largo de 14 días.

La figura 19B proporciona un gráfico que demuestra que el efecto inhibidor del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación de esferas por células del cáncer colorrectal primario HCT116 positivas a LGR5 en cultivo de baja adherencia continúa durante por lo menos 17 días después de retirar los anticuerpos.

La figura 20 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del tratamiento con cuatro anticuerpos

monoclonales anti-progastrina diferentes sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal primario CRC1 cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 21 proporciona un gráfico que demuestra el efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal metastásico T84 cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 22 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del tratamiento con cuatro anticuerpos monoclonales anti-progastrina diferentes sobre el crecimiento de células del cáncer colorrectal primario positivas a ALDH1 cultivadas en condiciones de cultivo tisular convencionales.

La figura 23 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del pretratamiento con cuatro anticuerpos monoclonales anti-progastrina diferentes sobre el crecimiento de células del cáncer colorrectal primario como esferoides cuando se cultivan en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 24 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del pretratamiento con anticuerpos monoclonales antiprogastrina sobre la expresión del marcador de células madre del cáncer ALDH1 en células del cáncer colorrectal metastásico T84.

La figura 25 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del pretratamiento con anticuerpos monoclonales antiprogastrina sobre la expresión del marcador de células madre del cáncer ALDH1 en células del cáncer colorrectal metastásico SW620.

La figura 26 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del pretratamiento con anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal metastásico T84 cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 27 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del pretratamiento con anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación de esferoides por células del cáncer colorrectal metastásico SW620 cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 28 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del tratamiento de ratones que portan xenoinjertos de cáncer colorrectal metastásico humano con anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la capacidad de células del cáncer colorrectal metastásico aisladas del xenoinjerto para crecer como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia.

La figura 29 proporciona un gráfico que demuestra el efecto del tratamiento de ratones que portan xenoinjertos de cáncer colorrectal metastásico humano con anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la capacidad de células del cáncer colorrectal metastásico aisladas del xenoinjerto para iniciar el crecimiento de un nuevo tumor cuando se trasplantan a otros ratones.

La figura 30 proporciona secuencias de aminoácidos de preprogastrina humana (SEC ID nº: 100), en las que la secuencia peptídica señal está subrayada, progastrina humana madura (SEC ID nº: 101) y determinados productos del procesamiento de la progastrina, que incluyen G34 (SEC ID nº: 102), G34-Gly (SEC ID nº: 103), G17 (SEC ID nº: 104), G17-Gly (SEC ID nº: 105) y CTFP (SEC ID nº: 106).

La figura 31. 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 31A proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb3 anti-hPG murino (SEC ID nº: 12) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 16);

La figura 31B proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb3 anti-hPG murino (SEC ID nº: 13) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 17);

La figura 31C proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb4 anti-hPG murino (SEC ID nº: 14) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 18);

La figura 31D proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb4 anti-hPG murino (SEC ID nº: 15) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 19);

La figura 31E proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb8 anti-hPG murino (SEC ID nº: 59) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 67);

La figura 31F proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb8 anti-hPG murino (SEC ID

nº: 63) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 71);

La figura 31G proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb13 anti-hPG murino (SEC ID nº: 60) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 68);

La figura 31H proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb13 anti-hPG murino (SEC ID nº: 64) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 72);

La figura 31I proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb16 anti-hPG murino (SEC ID nº: 61) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 69);

La figura 31J proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb16 anti-hPG murino (SEC ID nº: 65) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 73);

La figura 31K proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_H de MAb19 anti-hPG murino (SEC ID nº: 62) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 70); y

La figura 31L proporciona la secuencia de polipéptidos de la cadena V_L de MAb19 anti-hPG murino (SEC ID nº: 66) y una secuencia de polinucleótidos que la codifica (SEC ID nº: 74).

La figura 32 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:

La figura 32A proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb3 humanizado (SEC ID nº: 21);

La figura 32B proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb3 humanizado (SEC ID nº: 22);

La figura 32C proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb4 humanizado (SEC ID nº: 23);

La figura 32D proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb4 humanizado (SEC ID nº: 24);

La figura 32E proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb8(a) humanizado (SEC ID nº: 75);

La figura 32F proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_L de MAb8(a) humanizado (SEC ID nº: 76);

La figura 32G proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb8(b) humanizado (SEC ID nº: 77);

La figura 32H proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(b) humanizado (SEC ID nº: 78);

La figura 32I proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb8(c) humanizado (SEC ID nº: 79);

La figura 32J proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb8(c) humanizado (SEC ID nº: 76);

La figura 32K proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb13(a) humanizado (SEC ID nº: 80);

La figura 32L proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb13(a) humanizado (SEC ID nº: 81);

La figura 32M proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb13(b) humanizado (SEC ID nº: 82);

La figura 32N proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb13(b) humanizado (SEC ID nº: 83);

La figura 32O proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H de MAb16(a) humanizado (SEC ID nº: 84);

La figura 32P proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(a) humanizado (SEC ID nº: 85);

La figura 32Q proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb16(b) humanizado (SEC ID nº: 86);

La figura 32R proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb16(b) humanizado (SEC ID nº: 87);

La figura 32S proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb16(c) humanizado (SEC ID nº: 88);

La figura 32T proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_L de MAb16(c) humanizado (SEC ID nº: 89);

La figura 32U proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb19(a) humanizado (SEC ID nº: 90);

La figura 32V proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(a) humanizado (SEC ID nº: 91);

La figura 32W proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb19(b) humanizado (SEC ID nº: 92);

La figura 32X proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L de MAb19(b) humanizado (SEC ID nº: 93);

La figura 32Y proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_H de MAb19(c) humanizado (SEC ID nº: 94); y

La figura 32Z proporciona la secuencia de aminoácidos estimada de la cadena V_L de MAb19(c) humanizado (SEC ID nº: 95).

Descripción detallada

1. Metástasis del cáncer colorrectal

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

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

Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se piensa que la metástasis avanza a través una serie de distintas etapas, que incluyen invasión y migración, intravasación, circulación, extravasación y colonización, proliferación y angiogénesis. Durante la invasión y la migración, las células individuales se desprenden por sí mismas del tumor primario e invaden tejido sano adyacente. Para realizar esto, se ha formulado la hipótesis de que las células del cáncer experimentan una transformación fenotípica, denominada transición epitelial a mesenquimal. Kalluri, R., *et al.*, J. Clin. Invest., 119(6) (2009), 1420-28. Dichas células pueden producir enzimas que degradan la matriz extracelular, facilitando de esta forma la migración fuera del tumor primario y al tejido sano circundante. Cuando una célula en migración encuentra un vaso sanguíneo o linfático, se inserta en el mismo entre las células endoteliales que recubren los vasos y penetra en el torrente sanguíneo o en el sistema linfático. La célula aberrante se propaga después a través del sistema circulatorio o del sistema linfático a un nuevo órgano. La célula del cáncer puede alojarse a continuación en los vasos capilares o linfáticos del nuevo órgano y después extravasarse atravesando el endotelio y penetrando en el espacio tisular. Finalmente, durante la colonización, la proliferación y la angiogénesis, las células de cáncer metastásico 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 para suministrar oxígeno y nutrición requeridos por el tumor en rápido crecimiento.

2. Recurrencia del cáncer colorrectal

La recurrencia del cáncer colorrectal se define como la reaparición del cáncer colorrectal después de un tratamiento que aparentemente ha provocado que desaparezca el cáncer colorrectal. Si el cáncer colorrectal reaparecido se encuentra en la misma ubicación que el cáncer original o en una muy cercana, se conoce como recurrencia local. Cuando el cáncer colorrectal que reaparece crece en ganglios linfáticos o tejidos cercanos a la ubicación del cáncer original se conoce como recurrencia regional, y cuando el cáncer colorrectal que reaparece se metastatiza a órganos o tejidos alejados de la ubicación del cáncer original, se conoce como recurrencia distante.

3. Células madre del cáncer y cáncer colorrectal

Los tumores sólidos no son necesariamente tejidos homogéneos. Más bien algunos tumores comprenden una pluralidad de tipos celulares aberrantes que tienen distintas propiedades fenotípicas y funcionales. A este respecto, dichos tumores son análogos a órganos anormales. Una diferencia importante entre las células que comprenden tumores sólidos es la medida en la que son capaces de iniciar la formación de un nuevo tumor cuando se trasplantan a una nueva ubicación del mismo huésped, o a un nuevo huésped de la misma o de diferente especie. Las células que tienen esta propiedad se conocen como células iniciadoras de tumor o de cáncer, o alternativamente, células madre tumorales o cancerosas. Por el contrario, otras células que comprende el tumor tienen un potencial mucho más reducido de iniciar nuevos tumores después de un trasplante, incluso cuando se utilizan muchas más células. En un ejemplo no limitativo, varios cientos de células madre del cáncer de colon de tumores humanos fueron suficientes para iniciar un nuevo tumor después de su trasplante a ratones, mientras que 10.000 células no madre de los tumores fueron insuficientes para ello. Dalerba, P., *et al.*, 2007, "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:10158-10163.

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

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

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

Las células madre del cáncer pueden identificarse según una serie de características fenotípicas que las distinguen de las células de masa tumoral. En primer lugar, como se ha indicado anteriormente, las células madre del cáncer tienen la capacidad de iniciar un nuevo tumor cuando se trasplantan a un nuevo huésped. Por el contrario, las células de masa tumoral son o bien incapaces de iniciar nuevos tumores o bien requieren muchas más células que las células madre del cáncer para lograr la iniciación de nuevos tumores. Las células madre del cáncer se pueden identificar también por su expresión o no expresión de determinados marcadores,

mientras que las células de masa tumoral procedentes del mismo tumor tienen patrones diferentes de expresión de marcadores. Las células madre del cáncer también tienen una capacidad preferencial, en comparación con las células de masa tumoral, para crecer en condiciones de cultivo carentes de suero y de baja adherencia y formar los denominados esferoides. Otras diferencias fenotípicas capaces de distinguir células madre del cáncer de células de masa tumoral son posibles.

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

Los marcadores ejemplificativos que pueden utilizarse para identificar células madre del cáncer colorrectal incluyen, pero sin limitación: CD133, CD44, CD166, EpCAM y LGR5. También son posibles otros marcadores útiles para identificar células madre del cáncer colorrectal. En algunas formas de realización, la ausencia de expresión de un marcador es indicativa del fenotipo de célula madre del cáncer. Además, la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) es una enzima destoxificante y las células del cáncer pueden analizarse para determinar una actividad de ALDH1 aumentada, otro marcador para células madre del cáncer.

En algunas formas de realización de la presente divulgación pueden identificarse células madre del cáncer colorrectal por medio de los siguientes fenotipos de marcadores, utilizando FACS u otras técnicas familiares para los expertos en la materia: EpCAM(hi)CD44(+), EpCAM(hi)CD44(+)CD166(+), CD133(+), ALDH1 (+), CD133(-)/ALDH1 (+), CD44(+)/CD24(+) o LGR5(+). La expresión de otros marcadores, y las combinaciones y patrones de los mismos, también pueden utilizarse para identificar células madre del cáncer en estos cánceres, así como otros tipos de cáncer.

En otras formas de realización de la presente divulgación, pueden identificarse células madre del cáncer colorrectal utilizando análisis FACS dado que clasifica estas células en las denominadas células SP (*side population*) según su capacidad preferencial para excluir determinados colorantes. Un ejemplo no limitativo de dicho colorante es el colorante Hoechst 33342.

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

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

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

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

Las células pueden implantarse subcutáneamente, en almohadillas de grasa (tales como las almohadillas de grasa mamarias de ratones), en el cerebro, el ciego, el páncreas o el hígado, o en el riñón (como por ejemplo en la

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

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

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

4. Células madre del cáncer y recurrencia del cáncer colorrectal

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

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

Con respecto al papel de las células madre del cáncer en el mecanismo de recurrencia, se ha formulado la hipótesis de que mientras la mayor parte o incluso todas las células de masa tumoral se destruyen con el tratamiento, permanecen un número de células madre del cáncer viables que sobreviven gracias a su capacidad mejorada para resistir los efectos de la radiación o de la quimioterapia. Una vez ha concluido el tratamiento, estas células supervivientes continúan creciendo, permitiendo la reformación del tumor original o la formación de nuevos tumores. De acuerdo con esta teoría, se ha informado que el tratamiento de ratones con un agente quimioterápico provocó la reducción de tumores iniciados a partir de células del cáncer colorrectal humano, pero aumentó la proporción de células madre del cáncer en los tumores. Dylla, S.J., *et al.*, 2008, "Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogeneic Tumors Following Chemotherapy", *PLoS ONE,* 3 (6):e2428.

5. Avances en el entendimiento del papel de la progastrina en el cáncer colorrectal

Se ha descubierto sorprendentemente que existen células de cáncer colorrectal metastásico y células madre del cáncer colorrectal sensibles a progastrina como se demuestra mediante la capacidad de determinados anticuerpos que se unen específicamente a progastrina ("PG") para inhibir el crecimiento de dichas células *in vitro* o *in vivo.*

Una célula de cáncer colorrectal sensible a PG es una que depende, al menos parcialmente, de la progastrina para

su supervivencia y/o su crecimiento, directamente o indirectamente. Sin desear vincularse a ninguna teoría de operación particular, se ha planteado la hipótesis de que determinados anticuerpos anti-hPG son eficaces para inhibir la supervivencia y/o el crecimiento de dichas células uniéndose a PG y bloqueando la señalización dependiente de PG. Por lo tanto, se evita que la progastrina medie en su supervivencia y/o en efectos promotores del crecimiento. Pueden existir otros mecanismos por los que los anticuerpos anti-PG inhiben la supervivencia y/o el crecimiento de células de cáncer colorrectal y no se pretende que el mecanismo de acción particular limite el alcance de la presente divulgación.

Como se describe con mayor detalle en los ejemplos, los solicitantes han descubierto, sorprendentemente, que el gen de la gastrina (GAST) se expresa en seis estirpes celulares de cáncer colorrectal primario humanas diferentes, células HT29, HCT116, RKO, SW480, DLD1 y CRC1, y en dos líneas de células de cáncer colorrectal metastásico humanas diferentes, células SW620 y T84. Con respecto a los datos de los experimentos *in vitro*, los solicitantes también han descubierto, sorprendentemente, que el gen de la gastrina se expresó en el tumor colorrectal primario y la metástasis colorrectal asociada obtenidos de cada uno de 11 pacientes diferentes, aunque con respecto a los niveles en los tumores primarios el nivel de expresión en la metástasis asociada variaba entre los diferentes pacientes. Dado que la progastrina es un producto del gen de la gastrina (junto con otros péptidos procesados postraduccionalmente a partir del mismo producto génico), este dato sugiere que los tumores colorrectales primarios y metastásicos segregan progastrina. Unos experimentos adicionales, como se expone a continuación, lo confirman.

En primer lugar, los solicitantes confirmaron que se segregaron cantidades detectables de proteína PG en el medio de crecimiento por células SW620 y T84 (aunque no por células Colo-205). Adicionalmente, los solicitantes demostraron que pacientes que tienen solo cáncer colorrectal primario, cáncer colorrectal primario y metastásico simultáneamente y cáncer colorrectal metastásico después de extirpación del tumor primario, tenían todos niveles de PG en su sangre que eran estadísticamente significativamente superiores a los de la sangre de controles sanos. Estos resultados indican que los tumores colorrectales primarios y metastásicos segregan PG, que penetra directamente o indirectamente en el torrente sanguíneo. Por lo tanto, niveles de PG en sangre elevados son indicativos de la presente de cáncer colorrectal primario, así como metastásico. En consecuencia, los procedimientos de la presente divulgación proporcionan procedimientos para detectar o diagnosticar la presencia de cáncer colorrectal tanto primario como metastásico en diferentes poblaciones de pacientes.

Los solicitantes también han descubierto, sorprendentemente, que determinados anticuerpos anti-PG, es decir, anticuerpos neutralizantes, son capaces de inhibir el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico en cultivo. Específicamente, los solicitantes han demostrado experimentalmente que los anticuerpos policlonales anti-PG y cuatro diferentes anticuerpos monoclonales anti-PG fueron capaces de inhibir el crecimiento de células SW620 que crecían en cultivo. De forma similar, el crecimiento de células T84 se inhibió mediante la incubación con un anticuerpo monoclonal anti-PG. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-PG neutralizantes son capaces de prevenir el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico y que dichas células, por lo tanto, son sensibles a PG. Estos datos indican además que cantidades terapéuticamente eficaces de dichos anticuerpos, cuando se administran a un sujeto con necesidad de tratamiento de cáncer colorrectal metastásico, serán eficaces para tratar dicha metástasis.

Otros experimentos condujeron en ratones atímicos amplían y confirman los experimentos *in vitro* de los solicitantes. Así, los solicitantes inyectaron células SW620 metastásicas en el bazo de ratones atímicos. Poco después, el bazo se les extirpó, y se administró a los ratones un anticuerpo monoclonal anti-PG a lo largo de un transcurso de tiempo. Los animales de control se procesaron de forma similar, pero se les inyectó un anticuerpo de control. Después de seis semanas de tratamiento, los ratones se sacrificaron, y se hizo un recuento del número y el peso de las metástasis que se formaron en el hígado. Sorprendentemente, los solicitantes encontraron que el número medio de metástasis se redujo en un estadísticamente significativo 41% en los animales tratados frente a los animales de control. Los datos compilados confirman que los anticuerpos anti-PG neutralizantes son capaces de inhibir el crecimiento de cáncer colorrectal metastásico *in vivo,* y demuestran que cantidades terapéuticamente eficaces de dichos anticuerpos, cuando se administran a un sujeto con necesidad de tratamiento de cáncer colorrectal metastásico, son eficaces para tratar dichas metástasis.

Unos experimentos adicionales llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* por los solicitantes han demostrado, sorprendentemente, que los cánceres colorrectales metastásicos contienen células madre del cáncer colorrectal que son sensibles a PG y que los anticuerpos anti-hPG neutralizantes son capaces de inhibir el crecimiento de dichas células.

En un experimento, los solicitantes demostraron que el crecimiento de estirpes celulares de cáncer colorrectal primario (HT29, HCT116, CRC1) y metastásico (SW620 y T84) en condiciones de cultivo de baja adherencia aumentaron en la proporción de células que expresan LGR5, un marcador fenotípico de células madre de cáncer colorrectal. Dichas condiciones de cultivo seleccionan preferentemente el crecimiento de células madre del cáncer en comparación con la subpoblación de células no madre, y la expresión aumentada de LGR5 confirma que los cánceres colorrectales primarios y metastásicos contienen células madre del cáncer.

Después, los solicitantes descubrieron que las condiciones de baja adherencia aumentaron el nivel de expresión del gen de la gastrina en las mismas células en comparación con el crecimiento de las células en condiciones convencionales. Estos datos sugieren que la expresión del gen de la gastrina es superior en células madre del cáncer colorrectal de cánceres colorrectales tanto primarios como metastásicos en comparación con las células no madre en las mismas poblaciones, y sugieren adicionalmente que el nivel de progastrina segregada sería también superior. Los solicitantes confirmaron la expresión de progastrina en células CRC1, HT29, SW620 y T84 a diferentes niveles cuando se cultivan en condiciones de baja adherencia, lo que sugiere que estas estirpes celulares contienen células madre del cáncer colorrectal sensibles a PG.

Los solicitantes confirmaron esto último tratando células de cáncer colorrectal primario y metastásico cultivadas en condiciones de baja adherencia con anticuerpos anti-hPG y encontraron, sorprendentemente, que el número de los denominados esferoides celulares se redujo en comparación con el tratamiento con un anticuerpo de control. Debido a que la formación de esferoides en condiciones de baja adherencia es una propiedad de las células madre del cáncer, pero no de la subpoblación de células no madre, se interpreta que este resultado significa que los anticuerpos anti-hPG son eficaces para inhibir el crecimiento de células madre de cáncer colorrectal en cánceres colorrectales tanto primarios como metastásicos.

Por ejemplo, el tratamiento de células HT29, HCT116 y CRC1, todas las cuales son células de cáncer colorrectal primario, con anticuerpos policlonales anti-hPG dio como resultado una formación de esferas reducida. Analizando adicionalmente las células HCT116 y HT29 se encontró un efecto similar sobre el crecimiento de esferas mediante la subpoblación de células madre del cáncer positivas a LGR5 utilizando dos anticuerpos monoclonales anti-hPG diferentes. Es interesante señalar que la eliminación de los anticuerpos mediante lavado, seguido de una incubación continua durante 17 días en ausencia de anticuerpos añadidos no dio como resultado recuentos de esferas aumentados, lo que sugiere que el efecto inhibidor de los anticuerpos anti-hPG sobre células madre del cáncer colorrectal era permanente y no dependía de su presencia continua. El tratamiento de células CRC1 con cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG diferentes también fue eficaz para reducir la formación de esferas. Adicionalmente, el pretratamiento de células CRC1 cultivadas en condiciones convencionales con el mismo conjunto de anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo el número de células positivas a ALDH1, así como el número de esferoides formados después de que las células pretratadas se transfirieran a condiciones de cultivo de baja adherencia. Tres de los anticuerpos reconocieron la porción C-terminal de PG, mientras que uno reconoció la porción N-terminal.

Se obtuvieron resultados similares cuando se analizaron estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico. Así, después del aislamiento de la subpoblación de células T84 positivas a ALDH1, otro marcador para células madre del cáncer colorrectal, el número de esferoides formado por dichas células se redujo de una forma dependiente de la dosis mediante el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-hPG en comparación con el anticuerpo de control. De forma similar, el pretratamiento de células T84 y SW620 cultivadas en condiciones convencionales con el mismo anticuerpo monoclonal anti-hPG redujo el número de células positivas a ALDH1, así como el número de esferoides formados después de que las células pretratadas se transfirieran a condiciones de cultivo de baja adherencia. De hecho, el efecto inhibidor del crecimiento fue superior que el de 5-fluorouracilo, un fármaco quimioterápico. Estos datos confirman la conclusión sorprendente de que las células del cáncer colorrectal metastásico contienen células madre sensibles a la progastrina, cuyo crecimiento puede inhibirse con el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-hPG específico.

Como se ha abordado anteriormente, una de las propiedades características de células madre de cáncer es su capacidad para iniciar un nuevo tumor después de trasplante. Para confirmar la capacidad de anticuerpos anti-hPG para inhibir células madre de cáncer colorrectal, los solicitantes analizaron el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-hPG específico sobre la capacidad de células procedentes de la metástasis al hígado de cáncer colorrectal para crecer como esferoides en cultivo y para iniciar nuevos tumores después de su trasplante. Como se explica adicionalmente en los ejemplos, los solicitantes inyectaron células SW620 metastásicas en el bazo de ratones atímicos. Poco después, el bazo se les extirpó, y se administró a los ratones un anticuerpo monoclonal anti-PG a lo largo de un transcurso de tiempo. Los animales de control se procesaron de forma similar, pero se les inyectó un anticuerpo de control.

Después de seis semanas de tratamiento, los ratones se sacrificaron y la metástasis colorrectal que se formó en el hígado se diseccionó y después se trató para liberar células de cáncer colorrectal metastásico. A continuación, las células se analizaron para determinar su capacidad para formar esferoides en cultivo de baja adherencia y para formar nuevos tumores después de su trasplante a nuevos ratones. Estas dos propiedades son características de células madre del cáncer colorrectal.

Los resultados confirmaron el efecto inhibidor de anticuerpos anti-hPG sobre el crecimiento de células madre del cáncer colorrectal. En primer lugar los solicitantes encontraron que se formaron menos esferoides en cultivo de baja adherencia a partir de células de cáncer colorrectal metastásico procedentes del hígado de los animales tratados con anticuerpos específicos en comparación con los controles. Además, los solicitantes también encontraron que cuando se inyectaron por vía subcutánea células procedentes de los esferoides en los muslos de dos animales de ensayo nuevos, el tamaño de los tumores que crecieron a partir de las células tratadas *in vivo* con el anticuerpo

específico fueron en promedio considerablemente más reducidos que aquellos que crecieron a partir de células tratadas *in vivo* con anticuerpo de control. Estos resultados compilados demuestran que el tratamiento de células de cáncer colorrectal metastásico *in vivo* con un anticuerpo específico para hPG reduce el número de células madre de cáncer colorrectal en los tumores metastásicos.

Sobre la base de los resultados sorprendentes y convincentes descritos anteriormente, el tratamiento a pacientes con anticuerpos anti-hPG se espera que sea eficaz para prevenir la recurrencia de cáncer colorrectal primario o metastásico. Además, el efecto inhibidor de los anticuerpos sobre el crecimiento de dichas células madre puede no precisar la presencia continua de anticuerpos anti-hPG.

6. Anticuerpos

Los anticuerpos útiles en los procedimientos y los kits divulgados en la presente memoria son aquellos que se unen específicamente a progastrina humana antes que a otros productos del gen de la gastrina. Tal como se ilustra en la figura 30, el gen de la gastrina se traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos, denominado preprogastrina, que contiene una secuencia señal (subrayada) que se escinde, dando lugar a progastrina, un polipéptido de 80 aminoácidos. La progastrina, a su vez, se escinde para generar un producto de 34 aminoácidos, que corresponde en secuencia a los residuos 38-71 de la progastrina, que se extiende después en su extremo carboxi-terminal con un residuo de glicina, generando un G34 extendido con glicina ("G34-Gly"). Un subproducto de la escisión es un péptido de 6 aminoácidos denominado el péptido flanqueante C-terminal, o CTFP, que corresponde en secuencia a los residuos 75-80 de la progastrina. El G34-Gly se escinde después para generar un polipéptido de 17 residuos que corresponde en secuencia a los residuos 55-71 de la progastrina y se denomina G17-Gly. La eliminación de las glicinas C-terminales de G34-Gly y G17-Gly, seguida por la amidación C-terminal, proporciona G34 y G17, respectivamente, que se encuentran ambos amidados en sus extremos C-terminales.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo es “muy específico para” hPG o "se une de forma muy específica" a hPG si se une a progastrina de longitud completa pero no se une de ninguna forma a CTFP, a gastrina amidada o a gastrina extendida con glicina, y es “específico para" hPG o "se une específicamente a" hPG si muestra una unión por lo menos aproximadamente 5 veces superior a hPG que a CTFP y los otros productos del gen de la gastrina, 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 21.

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

La unión al epítopo 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 Nº PCT/EP2010/006329, presentada el 15 de octubre de 2010 y la solicitud de Estados Unidos Nº 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 se pueden utilizar 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 nº: 25). En la Tabla 1A, a continuación, y las secciones de Ejemplo se proporcionan inmunógenos ejemplificativos útiles para obtener anticuerpos anti-hPG N-terminales, así como secuencias CDR y VH y VL de anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales obtenidos con estos inmunógenos ejemplificativos:

TABLA 1A							
Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales							
Inmunógeno	**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	TRRDSPQY	(SEC ID nº: 3)		
			V_L CDR 1.3	QSIVHSNGNTY	(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	ATDGNYDWFAY	(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	SQSTHVPPT	(SEC ID nº: 11)		
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb15					
N2	1E9D9B6	MAb16	V_H CDR 1.16	GYTFTSYY	(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	QSLLDSDGKTY	(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	WQGTHSPYT	(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	GVGDAIKGQSVFV	(SEC ID nº: 58)		hV_L.19c (SEC ID nº: 95)
N2	1C11F5E8	MAb20					
Inmunógeno N1 = SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-BSA, también representado como (SEC ID nº: 25)-Ahx-Cys-BSA;							
Inmunógeno N2 = SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys-KLH, también representado como (SEC ID nº: 25)-Ahx-Cys-KLH							

ES 2 657 458 T3

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.

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 nº: 27). En la TABLA 1B, a continuación, y las secciones de Ejemplo se proporcionan inmunógenos ejemplificativos útiles para obtener anticuerpos anti-hPG C-terminales, así como secuencias CDR y VH y VL de anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales, obtenidos con estos inmunógenos ejemplares:

Tabla 1B

Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales

Inmunógeno	**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)**
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	QSLLDSDGKTY	(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	WQGTHFPQT	(SEC ID nº: 56)		
C1	2H9F4B7	MAb14					
C2	1F11F5E10	MAb21					
C2	1F11F5G9	MAb22					
C2	1A11F2C9	MAb23					

Inmunógeno C1 = KLH-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, también representado como KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 27)

Inmunógeno C2 = DT-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, 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 epítopos 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 epítopo putativo y se disponen en una membrana de nitrocelulosa que se sonda después con el anticuerpo de ensayo para determinar la secuencia de epítopo mínima reconocida por el anticuerpo. El barrido de alanina se utiliza para determinar residuos dentro de un epítopo que son críticos para la unión al anticuerpo. Cada residuo dentro de un epítopo putativo se muta, uno a uno, a una alanita, 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 epítopos comprenden por lo menos las secuencias siguientes: DAPLG (SEC ID nº: 28), PDAPLG (SEC ID nº: 29), PRSQQPD (SEC ID nº: 30), WKPRSQQPD (SEC ID nº: 31) o WKPRSQQPDAPLG (SEC ID nº: 32), tal como se muestra en la TABLA 2A, a continuación.

TABLA 2A		
Nº de MAb	**Antígeno de péptido PG: SWKPRSQQPDAPLG**	**SEC ID nº**
MAb2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb1	PDAPLG	29
MAb3	DAPLG	28
MAb 17	WKPRSQQPD	31
MAb18	WKPRSQQPD	31
MAb19	WKPRSQQPD	31
MAb20	WKPRSQQPD	31
MAb15	PRSQQPD	30
MAb16	PRSQQPD	30

Para los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales MAb 5-7, 9-12, 14 y 21-23, los epítopos 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 epítopo revelan que MAb2 y MAb4 anti-hPG se unen al mismo epítopo; MAb1 y MAb3 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítopo; MAb17, MAb18, MAb19 y MAb20 se unen aproximadamente al mismo epítopo; MAb15 y MAb16 se unen aproximadamente al mismo epítopo; MAb5, MAb6, MAb7, MAb9 y MAb12 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítopo y se unen aproximadamente al mismo epítopo que MAb10 anti-hPG; y MAb11 y MAb14 anti-hPG se unen aproximadamente al mismo epítopo.

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 epítopo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID nº: 28), los residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID nº: 29), los residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID nº: 30), los residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID nº: 31) o los residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID nº: 32).

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 epítopo que incluye los residuos 71 a 74

de hPG (SEC ID nº: 33), los residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID nº: 34), los residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID nº: 35) o los residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID nº: 36).

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 ejemplificativos 1-23, o con otros anticuerpos de referencia que se unen a epítopos N-terminales o C-terminales, tal como se describirá con más detalle en una sección posterior.

Como se demuestra en los Ejemplos, no todos los anticuerpos anti-hPG, incluso aquellos que muestran un alto grado de especificidad y de afinidad por la hPG, neutralizan la actividad biológica de la hPG. Por ejemplo, aunque el MAb14 anti-hPG se une a hPG con una K_D aproximadamente 6 pM, no inhibe, por lo menos en la concentración analizada, el crecimiento de determinas células del cáncer colorrectal en un ensayo *in vitro*, mientras que otros anticuerpos monoclonales anti-hPG, por ejemplo MAb1-MAb13 y MAb15-MAb23, muestran una actividad inhibidora en diversos grados. Aunque tanto los anticuerpos no neutralizantes como los neutralizantes que se unen específicamente a hPG son útiles para los procedimientos de diagnóstico de la presente divulgación, los anticuerpos anti-hPG útiles para procedimientos terapéuticos deberán mostrar actividad neutralizante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo anti-hPG neutralizante" es un anticuerpo anti-hPG que proporciona una reducción estadísticamente significativa del número de células del cáncer colorrectal vivas en una muestra de ensayo tratada con el anticuerpo anti-hPG en comparación con una muestra de control tratada con un anticuerpo no específico. Un ensayo específico para evaluar la capacidad de cualquier anticuerpo anti-hPG particular de ser neutralizante se describe en el Ejemplo 22. Aquellos anticuerpos anti-hPG que muestran por lo menos una reducción de aproximadamente el 50% en el número de células del cáncer colorrectal vivas en este ensayo se piensa que son especialmente útiles en el tratamiento del cáncer colorrectal, aunque se espera que los anticuerpos anti-hPG que muestran niveles inferiores de actividad neutralizante, por ejemplo una reducción estadísticamente significativa del 40%, 30%, 20%, 15% o incluso el 10%, en el número de células del cáncer colorrectal vivas en este ensayo proporcionen beneficios terapéuticos. Las células ejemplificativas para su utilización en estos ensayos incluyen, pero sin limitación, las estirpes celulares de cáncer colorrectal primario y metastásico descritas en la presente memoria.

En consecuencia, en algunas formas de realización, por ejemplo formas de realización terapéuticas, los anticuerpos anti-hPG útiles son neutralizantes. Tal como se divulga en la presente memoria y en las solicitudes '329 y '041, la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG para ser neutralizante no depende del epítopo, 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 neutralizantes son anticuerpos anti-hPG neutralizantes C-terminales.

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^{-6} a 10^{-12} M, tal como se indica en la TABLA 3, a continuación:

TABLA 3

Anticuerpo monoclonal	**Constante de afinidad medida Kd (M)**
MAb1 anti-hPG	2,5 μM (2,5 x 10^{-6} M)
MAb2 anti-hPG	185 nM (1,85 x 10^{-7} M)
MAb3 anti-hPG	6,4 nM (6,4 x 10^{-9} M)
MAb4 anti-hPG	3,5 nM (3,5 x 10^{-9} M)
MAb5 anti-hPG	13 pM (1,30 x 10^{-11} M)
MAb6 anti-hPG	0,6 nM (6,38 x 10^{-10} M)
MAb7 anti-hPG	58 pM (5,84 x 10^{-11} M)
MAb8 anti-hPG	0,1 nM (1,08 x 10^{-10} M)
MAb10 anti-hPG	3,6 nM (3,62 x 10^{-9} M)
MAb11 anti-hPG	0,3 nM (3,12 x 10^{-10} M)
MAb12 anti-hPG	0,4 nM (4,43 x 10^{-10} M)
MAb13 anti-hPG	0,6 nM (6,12 x 10^{-10} M)
MAb14 anti-hPG	6,8 pM (6,86 x 10^{-12} M)
MAb15 anti-hPG	0,2 nM (2,11 x 10^{-10} M)
MAb16 anti-hPG	0,2 nM (2,78 x 10^{-10} M)
MAb17 anti-hPG	8,3 nM (8,29 x 10^{-9} M)

TABLA 3	
Anticuerpo monoclonal	**Constante de afinidad medida Kd (M)**
MAb18 anti-hPG	1,2 nM (1,24 x 10^{-9} M)
MAb19 anti-hPG	0,7 nM (7,79 x 10^{-10} M)
MAb20 anti-hPG	0,2 nM (2,47 x 10^{-10} M)
MAb21 anti-hPG	3,9 nM (3,90 x 10^{-9} M)
MAb22 anti-hPG	5 nM (4,94 x 10^{-9} M)
MAb23 anti-hPG	0,4 µM (3,99 x 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 cadena pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) 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 memoria, tales como, por ejemplo, ELISA, calorimetría de valoración isotérmica (ITC), BIAcore o ensayos de polarización fluorescente. Se proporciona un ensayo específico en el ejemplo 23.

Como se representa en las tablas 1A y 1B, se han identificado diversos anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales y C-terminales. Todos estos anticuerpos son específicos para hPG y todos los enumerados excepto MAb14 muestran 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 (V_H), cadenas ligeras variables (V_L), regiones determinantes de complementariedad (CDR) de V_L y CDR de V_H. 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 mV_H y mV_L seguidos por el número del anticuerpo monoclonal correspondiente, por ejemplo mV_H.3 y mV_L.3 para las cadenas pesada variable y ligera variable de MAb3 anti-hPG, respectivamente. De forma similar, los dominios variables de cadena pesada y ligera humanos se denominan en la presente memoria hV_H y hV_L 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 V_H CDR 1, 2 o 3, y V_L CDR 1, 2 o 3, respectivamente, seguida por el número del anticuerpo monoclonal anti-hPG específico. Por ejemplo, V_H CDR 1 de MAb3 se denomina V_H CDR 1.3 y V_L CDR 1 de MAb3 se denomina V_L CDR 1.3. V_H CDR 2 de MAb3 se denomina V_H CDR 2.3 y V_L CDR 2 de MAb3 se denomina V_L CDR 2.3.

Se espera que las CDR y/o cadenas V_H y V_L 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 epítopo. Un anticuerpo monoclonal anti-hPG puede diseñarse de modo que incluya, en su cadena V_L, diversas combinaciones de las V_L CDR de estos dos anticuerpos, y/o en su cadena V_H diversas combinaciones de las V_H CDR de estos dos anticuerpos. Como ejemplo específico no limitativo para ilustrar las diversas combinaciones posibles, dicho anticuerpo podría incluir en su cadena V_L, CDR 1 y 2 de MAb5 (CDR V_L 1.5 y CDR V_L 2.5, respectivamente) y CDR 3 de MAb6 (V_L CDR 3.6), y en su cadena V_H, CDR 1 de MAb6 (V_H CDR 1.6) y CDR 2 y 3 de MAb5 (V_H CDR 2.5 y V_H CDR 3.5, respectivamente).

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de anticuerpos producidos por hibridomas que se han depositado pueden obtenerse utilizando medios convencionales. Por ejemplo, las secuencias relevantes de los anticuerpos producidos por hibridomas 6B5B11C10 y 20D2C3G2 se determinaron de la forma siguiente. En síntesis, se aisló ARN total de sedimentos celulares congelados utilizando reactivo RNABee, Nº de catálogo de AMSBio CS-104B, utilizado según las instrucciones del fabricante. Se preparó ADNc para regiones V a partir de ARNm utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), seguida por la amplificación rápida 5' de extremos del ADNc (RACE). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de la región constante, después de lo cual se purificó el producto de primera cadena y se utilizó desoxinucleótido transferasa terminal para añadir colas homopoliméricas a los extremos 3' del ADNc. Las secuencias de ADNc "con colas" se amplificaron después mediante PCR utilizando pares de cebadores, un cebador para cada cola homopolimérica y cualquiera de entre la región V_H o la región V_L, respectivamente. Los productos PCR de región variable de la cadena pesada y ligera se clonaron después en un vector de clonación "TA" (p-GEM-T easy, Nº de cat. de Promega A 1360) y se secuenciaron utilizando procedimientos estándar. Véanse las figuras 31A-B (MAb 3) y las figuras 31C-D (MAb 4).

De forma similar, se determinaron secuencias relevantes de anticuerpos producidos por hibridomas 1C10D3B9,

2C6C3C7, 1B3B4F1 y 1E9D9B61 de la forma siguiente. Se aisló ARN total de sedimentos celulares congelados utilizando el kit RNAqueous®-4PCR (Nº de cat. de Ambion AM1914) que se utilizó según las instrucciones del fabricante. Se amplificó ARNm de la región V de la cadena pesada utilizando un conjunto de seis agrupaciones de cebadores degenerados (HA a HF) y se amplificó ARNm de la región V de la cadena ligera utilizando un conjunto de ocho agrupaciones de cebadores degenerados, siete para el agrupamiento (*cluster*) κ (KA a KG) y uno para el agrupamiento (*cluster*) A (LA). Se preparó ADNc para regiones variables a partir de ARNm utilizando RT-PCR. La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de región constante, seguida por PCR utilizando agrupaciones de cebadores degenerados para secuencias de señal murinas 5' y cebadores para regiones constantes 3' para cada uno de IgGVH, IgκVL e IgλVL. (Jones *et al.*, 1991, Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions, Bio/Technology 9:88-89). Los productos PCR de región variable de la cadena pesada y ligera se clonaron después en un vector de clonación "TA" (p-GEM-T easy, Nº de cat. de Promega A 1360) y se secuenciaron utilizando procedimientos estándar. Véanse las figuras 31E-F (MAb 8), 31G-H (MAb 13), 31I-J (Mab 16) y 31K-L (Mab 19).

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

(a) anticuerpos que tienen V_L CDR que corresponden en secuencia a las V_L CDR de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20, y V_H CDR que corresponden en secuencia a las V_H CDR de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb19, MAb19 o MAb20;

(b) anticuerpos que tienen V_L CDR y V_H CDR que corresponden en secuencia a las V_L CDR y V_H CDR de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20;

(c) anticuerpos en los que:

i. V_L CDR 1 se selecciona de entre QSIV_HSNGNTY ("V_L CDR 1.3"; SEC ID nº: 4), QSLV_HSSGVTY ("V_L CDR 1.4"; SEC ID nº: 10), QSLLDSDGKTY ("V_L CDR 1.16"; SEC ID nº: 50) y SQHRTYT ("V_L CDR 1.19"; SEC ID nº: 51);

ii. V_L CDR2 se selecciona de entre KVS ("V_L CDR 2.3" y ("V_L CDR 2.4"; SEC ID nº: 5), LVS ("V_L CDR 2.16"; SEC ID nº: 53) y VKKDGSH ("V_L CDR 2.19"; SEC ID nº: 54);

iii. V_L CDR3 se selecciona de entre FQGSHVPFT ("V_L CDR 3.3"; SEC ID nº: 6), SQSTHVPPT ("V_L CDR 3.4"; SEC ID nº: 11), WQGTHSPYT ("V_L CDR 3.16"; SEC ID nº: 57) y GVGDAIKGQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEC ID nº: 58);

iv. V_H CDR1 se selecciona de entre GYIFTSYW ("V_H CDR 1.3"; SEC ID nº: 1), GYTFSSSW ("V_H CDR 1.4"; SEC ID nº: 7), GYTFTSYY ("V_H CDR 1.16"; SEC ID nº: 39) y GYSITSDYA ("V_H CDR 1.19"; SEC ID nº: 40);

v. V_H CDR2 se selecciona de entre FYPGNSDS ("V_H CDR 2.3"; SEC ID nº: 2), FLPGSGST ("V_H CDR 2.4"; SEC ID nº: 8), INPSNGGT ("V_H CDR 2.16"; SEC ID nº: 43) y ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEC ID nº: 44); y

vi. V_H CDR3 se selecciona de entre TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEC ID nº: 3), ATDGNYDWFAY ("V_H CDR 3.4" SEC ID nº: 9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEC ID nº: 47) y AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEC ID nº: 48);

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

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

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

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

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

(h) anticuerpos en los que:

(vii) VL CDR1 se selecciona de entre KSLRHTKGITF ("VL CDR 1.8"; SEC ID nº: 49) y QSLLDSDGKTY ("VL CDR 1.13"; SEC ID nº: 50);

(viii) VL CDR2 se selecciona de entre QMS ("VL CDR 2.8"; SEC ID nº: 52) y LVS ("VL CDR 2.13"; SEC ID nº: 53);

(ix) VL CDR3 se selecciona de entre AQNLELPLT ("VL CDR 3.8"; SEC ID nº: 55) y WQGTHFPQT ("VL CDR 3.13"; SEC ID nº: 56);

(x) VH CDR1 se selecciona de entre GFTFTTYA ("VH CDR 1.8"; SEC ID nº: 37) y GFIFSSYG ("VH CDR 1.13"; SEC ID nº: 38);

(xi) VH CDR2 se selecciona de entre ISSGGTYT ("VH CDR 2.8"; SEC ID nº: 41) y INTFGDRT ("VH CDR 2.13"; SEC ID nº: 42); y

(xii) VH CDR3 se selecciona de entre ATQGNYSLDF ("VH CDR 3.8"; SEC ID nº: 45) y ARGTGTY ("VH CDR 3.13"; SEC ID nº: 46);

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

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

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

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-hPG útiles para procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria están humanizados. En general, los anticuerpos humanizados comprenden sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de marco estructural son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana y pueden denominarse "CDR-injertada". El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para humanizar anticuerpos, incluidos procedimientos para diseñar anticuerpos humanizados, son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Lefranc *et al.*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27. 55-77; Lefranc *et al.*, 2009, Nucl. Acids Res. 37:D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-7; patentes US nº 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 nº 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 nº 5.565.332.

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

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

(l) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID nº: 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la SEC ID nº: 22;

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

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

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

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

(q) una región variable de la 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 la 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 epítopo 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 24.

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

Se conocen numerosos procedimientos para llevar a cabo ensayos de competencia de unión y pueden adaptarse para proporcionar resultados comparables al ensayo descrito anteriormente y en el ejemplo 24.

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

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

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

Aunque los diversos anticuerpos anti-hPG útiles en los procedimientos y kits descritos en la presente memoria se han ejemplificado con anticuerpos de longitud completa, los expertos apreciarán que también pueden utilizarse fragmentos de unión, o anticuerpos sustitutivos diseñados o derivados a partir de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión. Los fragmentos adecuados, sustitutivos, etc., incluyen, pero sin limitación, fragmentos y surrobodies Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, vIgG, scFv, rIgG, anticuerpos Fv estabilizados con disulfuro (dsFv), diacuerpos, triacuerpos, y anticuerpos de dominio simple, tales como un anticuerpo o nanocuerpo camelizado.

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

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

• Tratamientos convencionales para el cáncer colorrectal metastásico

El cáncer colorrectal metastásico puede tratarse con tratamiento biológico, tratamiento dirigido, tratamiento con anticuerpos, radioterapia, quimioterapia, cirugía, criocirugía o una combinación de las mismas. También son posibles otros tratamientos para el cáncer colorrectal metastásico.

El tratamiento biológico es un tratamiento para reforzar o restaurar la capacidad del sistema inmunitario para luchar contra el cáncer. Los agentes utilizados en tratamiento biológico incluyen modificadores de la respuesta biológica, tales como interferones, interleucinas, factores estimulantes de colonias, anticuerpos monoclonales, vacunas, tratamiento génico y agentes inmunomodulares no específicos. Algunos de estos agentes pueden tener también un efecto antitumoral directo. Los tratamientos contra el cáncer dirigidos son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la expansión del cáncer interfiriendo con moléculas específicas implicadas en el crecimiento y la progresión de tumores.

El tratamiento con anticuerpos implica la administración de un anticuerpo, incluidos, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, que destruyen, ralentizan o detienen, directa o indirectamente, el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico. Dichos anticuerpos pueden actuar por medio de una diversidad de distintos mecanismos. Por ejemplo, determinados anticuerpos pueden marcar células de cáncer para el ataque por el sistema inmunitario del paciente mediante citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) u otros mecanismos. Otros anticuerpos se unen y alteran o inhiben la función de antígenos que las células del cáncer necesitan para su supervivencia o su crecimiento. Se cree que una serie de anticuerpos funcionan de esta forma, incluido, por ejemplo, el bevacizumab (Avastin®), que se une al factor de crecimiento VEGF. También son posibles otros mecanismos, y anticuerpos particulares pueden ser capaces de actuar por medio de uno o más mecanismos de acción. Pueden conjugarse otros anticuerpos más a restos radiactivos o quimiotóxicos y dirigirlos a células del cáncer que expresan preferentemente antígenos reconocidos específicamente por los anticuerpos. Bevacizumab, cetuximab y panitumumab son ejemplos específicos de anticuerpos útiles en el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico.

La radioterapia es la utilización de radiación de alta energía producida por rayos X, rayos gamma, neutrones, protones y otras fuentes para destruir células de cáncer y reducir tumores. La radiación puede producirse mediante una máquina exterior al cuerpo (radioterapia de haz externo) o puede producirse mediante un material radiactivo dispuesto en el cuerpo cerca de células de cáncer (radioterapia interna o braquiterapia). La

radioterapia sistémica utiliza una sustancia radiactiva, tal como un anticuerpo monoclonal radiomarcado que se transporta en la sangre a tejidos a lo largo del cuerpo. La radioterapia también puede denominarse irradiación y tratamiento con radiación. Otras radioterapias incluyen radioterapia conformada tridimensional (3D-CRT) y radioterapia modulada por intensidad (IMRT). También son posibles otras radioterapias.

La quimioterapia es la utilización de fármacos de molécula orgánica pequeña para destruir (citotóxicos o citocidas) o prevenir el crecimiento (citostáticos) de células de cáncer. Muchos agentes quimioterápicos, que median su efecto antitumoral por medio de una diversidad de mecanismos, están disponibles para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico.

Los agentes quimioterápicos ejemplificativos incluyen los siguientes: antagonistas de folato, incluidos metotrexato y pemetrexed; antagonistas de purina, incluidas cladribina, clofarabina, fludarabina, 6-mercaptopurina, nelarabina, pentostatina; antagonistas de pirimidinas, incluidos capecitabina, citarabina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea; bleomicina; agentes alquilantes de ADN, incluidas nitrosoureas, carmustina, lomustina; fármacos reticulantes y agentes alquilantes del ADN, incluidos bendamustina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), melfalán, dacarbazina, temozolomida, procarbazina; asparaginasa; antibióticos, incluida la mitomicina; complejos de platino, incluidos carboplatino, cisplatino, oxaliplatino; inhibidores de proteosoma, incluido el bortezomib; venenos fusiformes, tales como los taxanos (incluidos docetaxel, paclitaxel) y las vincas (incluidas vinblastina, vincristina, vinorelbina); inhibidores de topoisomerasa, tales como las antraciclinas (incluidas daunorrubicina, daunomicina, doxorrubicina, epirrubicina), las camptotecinas, (incluidos irinotecán y topotecán), las podofilotoxinas (incluidos etopósido, tenipósido y mitoxantrona). También son posibles otros agentes quimioterápicos.

El cáncer colorrectal metastásico se trata frecuentemente utilizando agentes quimioterápicos en combinación entre sí y/o con antibióticos. Los ejemplos de dichas combinaciones incluyen 5-fluorouracilo (5FU) combinado con leucovorina (ácido folínico o LV); tegafur combinado con uracilo (UFT) y leucovorina; oxaliplatino combinado con 5FU, o en otra combinación con capecitabina; irinotecán combinado con capecitabina; mitomicina C combinada con 5FU, irinotecán o capecitabina; FOLFOX (leucovorina (ácido folínico), 5-FU y oxaliplatino) por sí mismo, o combinado con bevacizumab o cetuximab; FOLFIRI (leucovorina, 5-FU y irinotecán) por sí mismo, o combinado con bevacizumab o cetuximab; CapeOX (capecitabina y oxaliplatino) por sí mismo, o combinado con bevacizumab o cetuximab; 5-FU y leucovorina, combinados con bevacizumab; capecitabina combinada con bevacizumab; FOLFOXIRI (leucovorina, 5-FU, oxaliplatino y irinotecán); irinotecán combinado con cetuximab. Otros regímenes de combinación incluyen 5FU Mayo, 5FU Roswell Park, LVFU2, FOLFOX4, FOLFOX6, bFOL, FUFOX, IFL, XELOX, XELIRI y CAPIRI, que se describen con más detalle por Chau, I. y Cunningham, D., Br. J. Cancer 100 (2009) 1704-19; y Field, K. y Lipton, L., World J. Gastroenterol. 13 (2007) 3806-15. También son posibles otras combinaciones de agentes de quimioterapia y otros agentes terapéuticos.

• Procedimientos terapéuticos que utilizan anticuerpos anti-PG

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

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

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

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

Según otras formas de realización, los anticuerpos anti-PG divulgados en la presente memoria se administran en

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En algunas formas de realización, la administración de una composición de anticuerpos anti-hPG como complemento a un tratamiento principal puede proporcionar un efecto superior al aditivo, o sinérgico, proporcionando un beneficio terapéutico cuando ninguna de los tratamientos podría administrarse individualmente en una cantidad que fuera terapéuticamente eficaz sin incurrir en efectos secundarios inaceptables. En estas circunstancias, la composición de anticuerpos anti-hPG y/o el tratamiento principal pueden administrarse en cantidades más reducidas, reduciendo de esta forma la posibilidad de aparición de

efectos adversos o la gravedad de los mismos. No obstante, no se requiere un efecto sinérgico para que un tratamiento complementario con una composición de anticuerpos anti-hPG sea terapéuticamente eficaz.

7. Procedimientos para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento del cáncer colorrectal metastásico

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

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

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

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

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

Los niveles de concentración de PG en fluidos corporales pueden medirse utilizando técnicas analíticas familiares para los expertos en la materia, tales como, pero sin limitación, RIA y ELISA.

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

En una forma de realización específica, los niveles de PG pueden medirse utilizando un ELISA de tipo sándwich con un anticuerpo anti-PG dirigido al extremo N-terminal de la progastrina y un segundo anticuerpo anti-PG dirigido al extremo C terminal de la progastrina. Los anticuerpos anti-PG N-terminales y C-terminales ejemplificativos útiles para dicho ensayo de tipo sándwich se describen en una sección posterior. En dicho ensayo, se prepara una superficie, tal como los pocillos de una placa de 96 pocillos, a la que se une una cantidad conocida de un primer anticuerpo de “captura” anti-PG N-terminal o C-terminal. Después se aplica una muestra de ensayo a la superficie y se continúa con un periodo de incubación. La superficie se lava después para eliminar el antígeno no unido y se aplica una solución que contiene un segundo anticuerpo anti-PG "de detección", anticuerpo de detección que se une a un epítopo diferente de PG (por ejemplo, si el anticuerpo de captura es un anticuerpo anti-PG C-terminal, se utiliza un anticuerpo anti-PG N-terminal como anticuerpo de detección, y

viceversa). Los niveles de PG se miden después o bien directamente (si, por ejemplo, el anticuerpo de detección está conjugado a una marca detectable) o bien indirectamente (a través de un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo anti-PG de detección). Un ensayo de tipo sándwich específico para la medición de niveles de PG en plasma y/o suero se proporciona en el Ejemplo 20.

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

Según otras formas de realización de los procedimientos de la presente divulgación, una concentración de PG en sangre, suero o plasma inferior a un umbral predeterminado de menos de aproximadamente 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM o inferior es indicativa de eficacia en el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. Otros umbrales de concentración de PG indicativos de la eficacia también son posibles y los podrán determinar fácilmente los expertos en la materia.

8. Procedimientos de determinación de la presencia de cáncer colorrectal

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

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

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

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

A partir de los descubrimientos descritos en la presente memoria de que los cánceres colorrectales metastásicos segregan PG y son sensibles a PG, la presente divulgación también proporciona procedimientos para seleccionar sujetos que puedan beneficiarse de un tratamiento de administración de anticuerpos anti-PG. Por lo tanto, los sujetos pueden cribarse por profesionales de la salud para detectar si tienen niveles de PG elevados en plasma y/o suero con respecto a un valor de referencia. Una vez se han identificado dichos sujetos, los profesionales de la salud pueden ordenar ensayos adicionales para confirma la presencia de cáncer colorrectal en el sujeto. Si el cáncer colorrectal metastásico se confirma, puede comenzar un tratamiento, incluida la administración de anticuerpos anti-hPG.

En determinadas formas de realización de los procedimientos para seleccionar sujetos, el cribado puede realizarse como parte de un chequeo rutinario por parte del médico de atención primaria del sujeto o como parte de iniciativas de salud pública dirigidas a grandes poblaciones de sujetos. En otras formas de realización, los sujetos que se van a cribar son miembros de subpoblaciones particulares con un riesgo promedio más elevado de desarrollar cáncer colorrectal metastásico. Dichos grupos incluyen, pero sin limitación, sujetos que tienen una relación familiar cercana (padres, hermanos o hijos) que han tenido cáncer colorrectal, sujetos que tienen un historial de pólipos colorrectales, sujetos que son obesos, sujetos fumadores y sujetos que son físicamente inactivos. Otros de dichos sujetos son aquellos a los que se ha diagnosticado colitis ulcerativa, enfermedad de

Crohn o poliposis adenomatosa familiar (FAP), o aquellos que tienen mutaciones en el gen HNPCC, mutaciones en el gen APC u otros genes asociados con un riesgo aumentado de padecer cáncer colorrectal. Otros grupos más incluyen sujetos a los que se ha diagnosticado previamente y se ha tratado exitosamente cáncer colorrectal.

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

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

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

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

De acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia, los niveles de PG en muestras de un sujeto que superan un determinado umbral con respecto al valor de referencia se considera que padecen cáncer colorrectal o cáncer colorrectal que ha recurrido después del tratamiento. El equipo de tratamiento pueden llevar a cabo a continuación pruebas confirmatorias para confirmar la presencia de cáncer colorrectal. Los ejemplos no limitativos de dichas pruebas incluyen cirugía exploratoria para detectar cáncer colorrectal, una prueba de imagenología médica para detectar cáncer colorrectal, un análisis de las deposiciones del sujeto para detectar sangre oculta, una colonoscopia, un análisis de una muestra obtenida de un sujeto para determinar la presencia de mutaciones génicas, tales como en el gen HNPCC o el gen APC, que son indicativas de un riesgo aumentado de padecer cáncer colorrectal, y un análisis de una muestra obtenida de un sujeto para determinar la presencia de un factor biológico, tal como el antígeno carcinoembrionario (CEA), que es indicativa de cáncer colorrectal.

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

9. Composiciones farmacéuticas

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

Los anticuerpos anti-PG pueden administrarse a un sujeto utilizando una diversidad de vías, normalmente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. La administración puede efectuarse en forma una o más inyecciones en embolada, o en forma de una o más infusiones. También son posibles otras vías de administración de acuerdo con los conocimientos de los expertos en la materia. La vía más adecuada de administración en cualquier caso dado dependerá de la composición

particular que se va a administrar y de las características del sujeto, tales como la edad o el sexo.

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

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden prepararse para 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, isotonificantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros diversos aditivos. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para el receptor en las dosis y concentraciones empleadas.

Los agentes tampón ayudan a mantener el pH en un intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes en concentraciones que varían de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Agentes tampón adecuados para su utilización en la presente divulgación incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato de monosodio-citrato de disodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de trisodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de monosodio, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato de monosodio, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-succinato de disodio, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato de monosodio, mezcla de ácido fumárico-fumarato de disodio, mezcla de fumarato de monosodio-fumarato de disodio, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), tampón de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones de lactato (por ejemplo, mezla 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 isotonificantes, 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, mioinisitol, 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, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 partes en peso por cada parte en peso de proteína activa.

Pueden añadirse tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como 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, polioxietilen-sorbitan-monoéteres (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. No obstante, los tensioactivos tienen la tendencia de unirse a anticuerpos

y pueden afectar a sus conformaciones. Por lo tanto, cuando se utilizan, las concentraciones de estabilizantes deberían ser bajas y determinarse experimentalmente.

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

Los anticuerpos anti-hPG pueden administrarse individualmente o en forma de mezclas de uno o más anticuerpos anti-hPG solos o en mezcla o combinación con otros agentes útiles en la prevención de la metástasis o la recurrencia del cáncer colorrectal, incluidos, pero sin limitación, agentes quimioterápicos, agentes de tratamiento biológico y agentes de tratamiento con anticuerpos (por ejemplo, bevacizumab).

10. Kits farmacéuticos

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

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

11. Dosis eficaces

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

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

También puede medirse un beneficio terapéutico en términos de la supervivencia libre de progresión (PFS). En este contexto, se mide cuánto tiempo necesita un sujeto que padece inicialmente cáncer colorrectal en el estadio II, III o IV para progresar a un estadio más avanzado de la enfermedad. Un aumento de la PFS de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más meses se considera que proporcionar un beneficio terapéutico.

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

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

Con respecto a la prevención de la metástasis del cáncer colorrectal, una dosificación eficaz es una que es eficaz para prevenir por lo menos parcialmente el cáncer colorrectal metastásico, como se evidencia, entre otras cosas, por la ausencia de metástasis de cáncer colorrectal, el retardo, la detención o la ralentización del crecimiento de la metástasis del cáncer colorrectal, la reducción del número y/o el tamaño de cualesquiera metástasis colorrectales que puedan ocurrir en último término, y la inhibición de, o la interferencia con, cualquiera de las

etapas mecánicas por las que las células del cáncer colorrectal metastásico sean capaces de extenderse a partir del tumor primario. La prevención completa de la metástasis del cáncer colorrectal, aunque deseada, no es necesaria para que exista eficacia.

Con respecto a la prevención de la recurrencia del cáncer colorrectal, una dosificación eficaz es una que es eficaz para prevenir por lo menos parcialmente la recurrencia del cáncer colorrectal, como se evidencia, entre otras cosas, por la ausencia de recurrencia de cáncer colorrectal, el mantenimiento de la remisión del cáncer colorrectal, o el retardo, la detención o la ralentización de la reaparición o el recrecimiento del cáncer colorrectal, o el crecimiento de un nuevo tumor colorrectal, en un sujeto después de un tratamiento en el que el cáncer colorrectal inicial se había vuelto indetectable o, aparentemente, había desaparecido. La eficacia de prevención de la recurrencia del cáncer colorrectal también se evidencia, entre otras cosas, por la destrucción de las células madre del cáncer colorrectal, el retardo, la detención, la inhibición o la ralentización del crecimiento o la proliferación de células madre del cáncer colorrectal, el aumento de la apoptosis de células madre del cáncer colorrectal, o por causar la diferenciación de células madre de cáncer colorrectal en células que no son capaces de contribuir a la formación o el crecimiento de cáncer colorrectal. Tal como se describe en otra parte de la presente memoria, las células madre del cáncer colorrectal se pueden identificar porque tienen uno o más atributos fenotípicos característicos de dichas células que incluyen, pero sin limitación, la expresión de determinados marcadores celulares, la capacidad de crecer en forma de esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia y la capacidad de iniciar el crecimiento de nuevos tumores después de un trasplante. La prevención completa de la recurrencia del cáncer colorrectal, aunque deseada, no es necesaria para que exista eficacia.

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

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

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

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

En formas de realización específicas, puede determinarse una dosis i.v. para un sujeto individual midiendo la concentración de PG en suero o plasma del individuo unas pocas veces de unos pocos días a unas pocas semanas antes del tratamiento y calculando una cantidad de anticuerpo anti-PG que 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 farmacocinética y biodisponibilidad, como se sabe en la técnica.

La dosis eficaz de una composición de anticuerpos anti-hPG puede variar de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg por administración individual (por ejemplo, inyección en embolada), administraciones múltiples o administración continua (por ejemplo infusión), o cualquier intervalo o valor eficaz del mismo dependiendo del tipo de cáncer cuya recurrencia se busca prevenir, la vía de administración y la edad, el peso y la condición del sujeto. En determinadas formas de realización, cada dosis puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg; de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 0,75 mg/kg; de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg; aproximadamente 2 mg/kg; de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg; de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg; de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 3,5 mg/kg; de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg; de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg; de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg; de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg; de aproximadamente 6 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg; de aproximadamente 7 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg; de aproximadamente 8 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg; de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg; de aproximadamente 12,5 mg/kg a aproximadamente 17,5 mg/kg; de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg; de aproximadamente 17,5 mg/kg a aproximadamente 22,5 mg/kg; de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg; de aproximadamente 22,5 mg/kg a aproximadamente 27,5 mg/kg; de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg; de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg; de aproximadamente 35 mg/kg a aproximadamente 45 mg/kg; de aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; de aproximadamente 45 mg/kg a aproximadamente 55 mg/kg; de aproximadamente 50 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg; de aproximadamente 55 mg/kg a aproximadamente 65 mg/kg; de aproximadamente 60 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg; de aproximadamente 65 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg; de aproximadamente 70 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg; de aproximadamente 75 mg/kg a aproximadamente 85 mg/kg; de aproximadamente 80 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg; de aproximadamente 85 mg/kg a aproximadamente 95 mg/kg; de aproximadamente 90 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg; de aproximadamente 95 mg/kg a aproximadamente 105 mg/kg; de aproximadamente 100 mg/kg a aproximadamente 150 mg/kg; de aproximadamente 125 mg/kg a aproximadamente 175 mg/kg; de aproximadamente 150 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg; de aproximadamente 175 mg/kg a aproximadamente 225 mg/kg; de aproximadamente 200 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg. También son posibles otros intervalos de dosificación.

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

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión del gen de la gastrina en células de cáncer colorrectal metastásico

Este ejemplo describe la expresión del gen de la gastrina (GAST) en las estirpes celulares de cancer colorrectal primario humano HT29, HCT116, RKO, SW480 y DLD1 y las estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico SW620 y T84. Se analizaron también células aisladas de una muestra de biopsia de un tumor colorrectal primario humano (CRC1). Las células SW620 se derivaron originariamente de una metástasis de ganglio linfático de un paciente diagnosticado con adenocarcinoma colorrectal de Dukes en el estadio C. Las células T84 se derivaron originariamente de una metástasis de pulmón de un paciente diagnosticado con carcinoma colorrectal.

A. PROCEDIMIENTOS

Utilizando técnicas estándar, se cuantificó la expresión del ARNm de GAST utilizando RT-PCR cuantitativa a partir de preparaciones de ARN de las estirpes celulares HT29, HCT116, RKO, SW480, DLD1, SW620 y T84.

Los datos se expresan en comparación con el nivel de expresión de ARNm de gastrina encontrado en la estirpe celular de cáncer colorrectal primario RKO. Las células RKO expresan normalmente niveles bajos de progastrina. Nótese que los niveles de ARNm de gastrina relativos se indican en una escala logarítmica.

B. RESULTADOS

Los niveles de expresión del gen de la gastrina medidos por RT-PCR cuantitativa se muestran en la figura 1. Todas las células de cáncer colorrectal metastásico examinadas expresaron el gen de la gastrina, pero a niveles variables. Mediante procesamiento postraduccional, el producto del gen de la gastrina puede convertirse en progastrina.

Se realizó un experimento similar utilizando la estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico Colo-205, pero los resultados no fueron reproducibles.

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

Este ejemplo describe la expresión del gen de la gastrina (GAST) en tumores colorrectales primarios y metastásicos correspondientes extirpados quirúrgicamente de pacientes.

A. PROCEDIMIENTOS

Los tumores colorrectales primarios y metastásicos se extirparon quirúrgicamente de pacientes según directrices éticas aplicables. Utilizando técnicas estándar, se preparó ARN de las muestras de tejido tumoral y se midió el ARNm de la gastrina mediante RT-PCR cuantitativa. La expresión del ARNm de la gastrina en el tumor metastásico se normalizó con respecto al nivel de expresión en el tumor primario correspondiente tomado del mismo paciente.

B. RESULTADOS

Los niveles de ARNm de gastrina expresados en tumores colorrectales metastásicos de 11 pacientes con respecto a la expresión en tumores primarios correspondientes del mismo paciente se muestran en la figura 2. Aunque todos los tumores colorrectales primarios y metastásicos estudiados expresaron el gen de la gastrina, el nivel de expresión en tumores metastásicos con respecto al tumor primario correspondiente varió ampliamente entre los diferentes pacientes.

Ejemplo 3: Secreción de progastrina por células de cáncer metastásico

Este ejemplo describe la cuantificación de la secreción de progastrina por tres células de cáncer colorrectal metastásico diferentes.

A. PROCEDIMIENTOS

Las células se cultivaron en matraces de 75 cm^2 de plástico normales hasta el 60% de confluencia. A continuación se retiró el medio y las células se enjuagaron una vez con PBS. A continuación se añadieron veinte ml de medio M11 (sin rojo de fenol) a los matraces y las células se incubaron durante 48 horas adicionales. A continuación el medio se recogió, se centrifugó a 1.000 g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares y se congeló a -80ºC. A continuación las células se tripsinizaron y se contaron.

Para medir la progastrina secretada, el medio de cultivo 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.

B. RESULTADOS

La figura 3 muestra la concentración de progastrina en medio acondicionado por tres estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico. Los datos se expresan como concentración de progastrina de células por millón en pM por 48 horas de cultivo. En este experimento, las células Colo-205 no produjeron PG dentro de los límites de detección del ensayo utilizado.

Ejemplo 4: Concentraciones de progastrina en plasma o suero en pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal primario o metastásico

Este ejemplo describe la cuantificación de niveles de progastrina en plasma o suero en pacientes con cáncer colorrectal primario y sin metástasis, pacientes con cáncer colorrectal metastásico y pacientes con cáncer

colorrectal metastásico a los que se ha extirpado quirúrgicamente el tumor primario.

A. PROCEDIMIENTOS

Las concentraciones de progastrina en plasma o suero se midieron en individuos sanos, como control, y en pacientes con cáncer colorrectal. Las muestras de control sanas (n=104) se obtuvieron de un banco de sangre. Los pacientes con cáncer colorrectal comprendían tres grupos. En primer lugar, los pacientes a los que se había diagnosticado en el momento del muestreo cáncer primario sin metástasis (T+M-; n=16). En segundo lugar, pacientes a los que se había diagnosticado en el momento del muestro enfermedad metastásica (T+M+; n=24). Y en tercer lugar, pacientes que se había diagnosticado en el momento del muestreo enfermedad metastásica pero a los que se había extirpado quirúrgicamente el tumor primario (T-M+; n=46). La mayor parte de los pacientes con enfermedad metastásica, es decir, 15 de pacientes 24 T+M+, y 41 de 46 pacientes T-M+, se sometieron o se habían sometido ya a quimioterapia en el momento de la toma de muestra.

La cuantificación de los niveles de progastrina en suero o plasma se realiza utilizando una técnica de ELISA en sándwich específica para la progastrina similar a la descrita de manera anticipatoria a continuación.

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 4ºC. 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 incuba durante 2 horas a 22ºC. 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 22ºC. 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 incuba durante 1 hora a 22ºC.

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

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.

B. RESULTADOS

Las gráficas de caja de la figura 4 muestran un porcentil 25, la media y un porcentil 75 de concentraciones de progastrina en plasma o suero en los tres grupos de pacientes con cáncer colorrectal analizados, en comparación con controles sanos. Los trazos indican porcentiles de 5 y 95 de concentraciones de progastrina en

plasma o suero. T+ o T- indican que el tumor primario se encuentra aún en su ubicación o se ha extirpado, respectivamente; M+ o M- indican que existía metástasis, o no se detectó en pacientes, respectivamente. La tabla 4 contiene un resumen de los análisis estadísticos de los datos brutos.

Estos datos demuestran que los pacientes con cáncer colorrectal tanto primario como metastásico tenían niveles elevados de progastrina en su plasma o su suero en comparación con individuos sanos. Además, los niveles de progastrina continuaron siendo elevados en pacientes con cáncer colorrectal metastásico en aquellos a los que se había extirpado quirúrgicamente el tumor primario. Esto sugiere que la metástasis colorrectal produce progastrina en dichos pacientes.

TABLA 4

Tabla analizada	PG en pacientes con CRC		
Ensayo de Kruskal-Wallis			
Valor de P	< 0,0001		
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana		
Resumen del valor de P	***		
Varían las medianas signif. (P < 0,05)	Sí		
Número de grupos	4		
Estadística de Kruskal-Wallis	33,86		
Ensayo de comparación múltiple de Dunn	Diferencia en la suma de rango	¿Significativa? ¿P<0,05?	Resumen
Pacientes T+M- frente a controles (banco de sangre)	51,45	Sí	***
Pacientes T+M+ frente a controles (banco de sangre)	50,41	Sí	***
Pacientes T-M+ frente a controles (banco de sangre)	37,42	Sí	***

Ejemplo 5: Efecto de anticuerpos policlonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico SW620 en cultivo

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos policlonales anti-hPG sobre el crecimiento de la estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico humanas SW620 en cultivo.

A. PROCEDIMIENTOS

Se sembraron células SW620 en placas de 6 pocillos, se privaron de suero durante toda la noche, después se trataron cada 12 horas con PBS, 3 microgramos/ml de anticuerpo de control (IgG antihumana de conejo policlonal, Affinity BioReagents, Nº de ref. SA1-600) o anticuerpos policlonales anti-PG. El experimento se llevó a cabo por duplicado, y el técnico estaba cegado con respecto a los contenidos de las soluciones de tratamiento. Setenta y dos horas después del inicio de los tratamientos se realizó un recuento por triplicado del número de células supervivientes en cada pocillo.

B. RESULTADOS

Como se muestra en la figura 5, el tratamiento con anticuerpos policlonales anti-PG provocó un 43,5 % de reducción en el crecimiento de células SW620 a lo largo de un periodo de 72 horas (p=0,0294, ensayo de Mann Whitney; n=2). Los resultados de este experimento demuestran que los anticuerpos policlonales frente a PG son eficaces para reducir el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico *in vitro.*

Ejemplo 6: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico SW620 en cultivo

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de la estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico humanas SW620 en cultivo.

A. PROCEDIMIENTOS

Se sembraron células SW620 en placas de 6 pocillos, se privaron de suero durante toda la noche, después se trataron cada 12 horas con PBS, 3 microgramos/ml de anticuerpo de control (IgG antihumana de ratón, Calbiochem, Nº de ref. 411451) o cuatro anticuerpos monoclonales anti-PG diferentes, MAb3, MAb4, MAb2 y Mab1. El experimento se llevó a cabo por duplicado, y el técnico estaba cegado con respecto a los contenidos de las soluciones de tratamiento. Cuarenta y ocho horas después del inicio de los tratamientos se contaron seis

veces y se promediaron las células supervivientes en cada pocillo.

En un experimento aparte, se sembraron células SW620 en placas de 6 pocillos (100.000 células por pocillo) y se trataron de forma similar a anteriormente con 5 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-hPG 5-23 (es decir, MAb5-MAb23) o 5 µg/ml de anticuerpo de control. Después de 48 horas se contó el número de células viables del que se sustrajo el número de células al inicio del experimento (es decir, T0). El número de células supervivientes en los pocillos tratados con anticuerpo específico se expresó después como un porcentaje del control.

B. RESULTADOS

Los resultados, mostrados en la figura 6A, del tratamiento de células SW620 con MAb1-MAb4 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 números brutos y la estadística (Ensayo de Mann Whitney) se muestran en la tabla 5. Los resultados de este experimento demuestran que diferentes anticuerpos monoclonales contra PG son eficaces para reducir el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico SW620 *in vitro,* en comparación con un anticuerpo de control. Los resultados también muestran que aunque todos los anticuerpos monoclonales contra PG fueron eficaces para reducir el crecimiento de las células en comparación con el anticuerpo de control, dos de los anticuerpos, MAb3 y MAb4, fueron más eficaces que los otros.

TABLA 5

Tratamiento de anticuerpo	**Recuentos de células**	**Valor de p (tratado frente a Mab CT)**
Anticuerpo CT-T0	158556	
MAb3-T0	50056	0,0009
MAb4-T0	52984	0,0014
MAb2-T0	115056	0,0156
MAb1-T0	108056	0,0009

Los resultados del tratamiento de células SW620 con MAb5-MAb23, siendo cada una de los mismos capaces de unirse específicamente a hPG, se muestran en la figura 6B. Como los resultados demuestran, en comparación con un anticuerpo de control no específico, los anticuerpos monoclonales anti-hPG analizados muestran un intervalo de eficacia para inhibir el crecimiento de la estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico SW620 en cultivo.

Se realizó un experimento relacionado para determinar el efecto sobre el crecimiento del tratamiento de células de cáncer colorrectal metastásico Colo-205 con MAb3, pero los resultados no eran reproducibles.

Ejemplo 7: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico T84 en cultivo

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales anti-hPG sobre el crecimiento de la estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico humanas T84 en cultivo.

A. PROCEDIMIENTOS

Los procedimientos empleados para este experimento fueron similares a los utilizados para medir el efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre células SW620, excepto en que el anticuerpo anti-progastrina utilizado fue MAb3 anti-hPG.

B. 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. En la tabla 6 se muestra un resumen del análisis estadístico. Los resultados de este experimento demuestran que el MAb3 anti-hPG es eficaz para reducir el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico T84 *in vitro,* en comparación con un anticuerpo de control.

TABLA 6

Tabla analizada	Células T84
Columna E	MAb CT-T0
frente a	frente a
Columna F	MAb3 anti-PG-T0
Ensayo de Mann Whitney	
Valor de P	0.0370
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana

TABLA 6	
Resumen del valor de P	*
¿Son las medianas signif. diferentes? (P < 0,05)	Sí
¿Valores de P de una cola o de dos colas?	Dos colas
Suma de rangos en la columna E,F	52,50, 25,50
Mann-Whitney U	4,500

Se realizó un experimento relacionado para determinar el efecto sobre el crecimiento del tratamiento de células de cáncer colorrectal metastásico Colo-205 con MAb3, pero los resultados no eran reproducibles.

Ejemplo 8: Efecto de anticuerpos policlonales anti-progastrina sobre la formación en ratones atímicos de metástasis hepática mediante xenoinjertos de células SW620

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos policlonales anti-PG sobre la capacidad de células SW620 para formar metástasis hepática después de trasplante a ratones atímicos.

A. PROCEDIMIENTOS

Se inyectó un total de $5x10^6$ células SW620 en el bazo de cada uno de los 31 ratones atímicos BALBc de 6 semanas de edad. Dos minutos después de la inyección de las células, los bazos se extirparon quirúrgicamente. Después de cuatro días de recuperación, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos, y cada uno de los grupos se sometió a uno de tres tratamientos diferentes. Específicamente, a once ratones se les inyectó PBS, a diez se les inyecto un anticuerpo de control diluido en PBS y a diez ratones se les inyectaron anticuerpos policlonales anti-PG, también diluidos en PBS. La dosis de anticuerpos fue de 8 mg/kg en un volumen de 150 microlitros. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante seis semanas. Seis semanas más tarde, después de finalizar la serie de inyecciones, los ratones se sacrificaron con dióxido de carbono y se extirparon los hígados y se contó el número de metástasis visibles presentes. También se prepararon hígados y metástasis para embeberlos en parafina y el análisis inmunohistoquímico.

B. RESULTADOS

En la figura 8A se muestra una fotografía del hígado sin metástasis visible de un ratón tratado con anticuerpos policlonales anti-hPG. En la figura 8B se muestran fotografías de hígados con metástasis visibles de ratones tratados con un anticuerpo policlonal de control. La tabla 7 muestra el número de metástasis contadas en cada uno de los hígados de ratones tratados con anticuerpos policlonales anti-hPG. La tabla 8 muestra el número de metástasis contadas en cada uno de los hígados de ratones tratados con anticuerpos policlonales de control. La tabla 9 muestra el número de metástasis contado en cada uno de los hígados de ratones tratados con PBS. La figura 9 es una representación gráfica del número de metástasis frente a brazos de tratamiento.

TABLA 7		
Ratón	Peso (g)	Nº de met. en hígados
0	20,1	0
1	17,7	2
2	17,3	0
3	21,2	0
4	19,9	0
5	19,9	3
6	17,0	0
7	18,1	0
8	16,7	2
9	16,6	1

TABLA 8		
Ratón	Peso (g)	Nº de met. en hígados
10	17,0	0
11	18,0	2
12	19,9	1
13	17,2	0
14	18,2	1
15	17,8	3
16	17,9	10
17	17,9	0
18	17,0	1
19	16,0	1

TABLA 9

TABLA 9		
Ratón	Peso (g)	Nº de met. en hígados
20	20,1	7
21	19,3	0
22	19,2	0
23	18,7	1
24	18,8	1
25	16,5	0
26	19,3	0
27	19,1	1
28	18,0	0
29	18,8	5
30	17,8	3

Los análisis histológicos revelaron la presencia de micrometástasis en secciones de hígados de ambos grupos de control que no estaban presentes en secciones obtenidas de hígados de animales tratados con anticuerpos anti-hPG. En la fotomicrografía mostrada en la figura 10 se muestra un ejemplo de una micrometástasis detectada en un vaso sanguíneo dentro del hígado de un animal de control.

Los resultados de este ejemplo demuestran que el tratamiento con anticuerpos anti-hPG de ratones atímicos a los que se han trasplantado células SW620, una estirpe celular metastásica de cáncer colorrectal, redujeron el número total de metástasis hepáticas visibles en comparación con ratones que recibieron anticuerpo de control o vehículo solo. Aunque la medida de la reducción no alcanzó significancia estadística, la tendencia en los datos numéricos, así como la ausencia de micrometástasis en el hígado de ratones tratados con anticuerpo anti-hPG, sugiere que los anticuerpos PG son eficaces para reducir la incidencia de metástasis de cáncer colorrectal en este sistema modelo.

Ejemplo 9: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre la formación en ratones atímicos de metástasis hepática mediante xenoinjertos de células SW620

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales anti-PG sobre la capacidad de células SW620 para formar metástasis al hígado después de trasplante a ratones atímicos.

A. PROCEDIMIENTOS

Se inyectó un total de $5x10^6$ células SW620 en el bazo de cada uno de los 20 ratones atímicos BALBc de 5 semanas de edad. Dos minutos después de la inyección de las células, los bazos se extirparon quirúrgicamente. Después de la recuperación, los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos, y cada uno de los grupos se sometió a uno de dos tratamientos diferentes. Específicamente, a 10 ratones se les inyectó anticuerpos de control (IgG1Fc anti-humana) diluido en PBS y a 10 ratones se les inyectó anticuerpo monoclonal anti-hPG MAb3, también diluido en PBS. La dosis de anticuerpos fue de 8 mg/kg en un volumen de 150 microlitros. Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante seis semanas. Una vez por semana se pesó cada uno de lo ratones. Seis semanas más tarde, después de finalizar la serie de inyección, los ratones se sacrificaron con dióxido de carbono y se extirparon los hígados y se contó el número de metástasis visibles presentes.

B. RESULTADOS

Los resultados se muestran en la figura 11. El número medio de metástasis fue de 7,3 en ratones a los que se administró anticuerpo de control y de 4,3 en ratones tratados con anticuerpo monoclonal anti-hPG MAb3. Esto corresponde a una reducción del 41%, y es estadísticamente significativo a una p = 0,0372. El análisis se muestra a continuación en la tabla 10. El peso medio de metástasis hepática en los ratones tratados también se redujo a 96 mg, en comparación con 167 mg de los ratones de control, aunque se calculó que esta diferencia no alcanzaba significancia estadística.

TABLA 10	
Tabla analizada	Número de metástasis
Columna A	MAb de ctrl
vs	vs
Columna B	MAb3
Ensayo de Mann Whitney	
Valor de P	0,0372
¿Valor de P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana
Resumen del valor de P	*
¿Son las medianas signif. diferentes? (P < 0,05)	Sí

TABLA 10	
¿Valores de P de una cola o de dos colas?	Una cola
Suma de rangos en la columna A,B	129, 81
Mann-Whitney U	26,00

Ejemplo 10: La expresión de LGR5 en células de cáncer colorrectal se aumenta mediante el cultivo en condiciones de cultivo de baja adherencia

Este ejemplo describe el efecto sobre la expresión del marcador de superficie de células madre de colon LGR5 en estirpes celulares de cáncer colorrectal del cultivo en condiciones de cultivo de baja adherencia. Las células analizadas incluyeron células de cáncer colorrectal primario y estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico, células de una muestra de biopsia obtenida del cáncer colorrectal primario humano. Las condiciones de cultivo de baja adherencia pueden enriquecerse para lograr el crecimiento de células madre de cáncer como esferoides y proporcionar una herramienta de ensayo útil para células madre de cáncer colorrectal.

A. PROCEDIMIENTOS

Las células analizadas eran de las estirpes celulares de cáncer colorrectal primario HT29 y HCT116 y de las estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico SW620 y T84. También se analizaron células aisladas de una muestra de biopsia de un tumor colorrectal primario humano (CRC1). Las muestras de biopsia se enjuagaron varias veces en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), después se dispusieron 30 min a temperatura ambiente en una solución de hipoclorito de sodio al 0,4% en HBSS. Después de varios enjuagues adicionales con HBSS, las biopsias se cortaron en trozos de 1 mm utilizando cuchillas de escalpelo y se enjuagaron. Los trozos se incubaron después durante 1 h a 37ºC en una solución de Accumax al 50% en medio M11 que contenía antibióticos fuertes y glucosa (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciproflaxina, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa), agitando suavemente una vez cada 20 min. La solución de Accumax que contenía estas muestras digeridas se filtró después utilizando tamices de 100 micrómetros. La viabilidad se determinó en una parte alícuota pequeña de la solución filtrada utilizando la técnica del azul de triptano. La solución se centrifugó después a 200 g durante 10 min y el sedimento se resuspendió en 2 ml de medio M11 que contenía el 10% de FBS con el fin de detener la reacción de Accumax. Las células se incubaron después en matraces de adherencia ultra-baja Corning durante varios días y después se transfirieron a medio M11 sin FBS para una amplificación posterior. Las células de la muestra de CRC1 se amplificaron durante varias semanas y se congelaron/descongelaron una vez se hubo realizado el experimento.

Las células se cultivaron en dos condiciones de cultivo diferentes. En primer lugar, las células se cultivaron en recipientes de cultivo de plástico estándar para el crecimiento de células de mamífero, que promueve la unión celular a la superficie. Específicamente, se sembraron 200.000 células en matraces de 75 cm^2 (Corning) en DMEM + 5% de suero de bovino fetal (FBS) + 100 U/ml de penicilina + 100U/ml de estreptomicina.

En segundo lugar, las células se cultivaron en recipientes de cultivo de baja adherencia a los que las células de mamífero se unen normalmente de forma deficiente o no lo hacen. Específicamente, se cultivaron 30.000 células en matraces de 75 cm^2 de adherencia ultra-baja (Corning) en medio M11 (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciproflaxina, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Después de un periodo de crecimiento, las células se resuspendieron y se disgregaron en una suspensión de células individual utilizando Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc.) durante 45 minutos a 37ºC antes del análisis FACS. Utilizando técnicas estándar, las células se tiñeron a continuación con un anticuerpo en la región N-terminal del marcador de superficie celular LGR5 (Abgent, Inc.) y se clasificaron por FACS para determinar el porcentaje de células que expresan el marcador. Todos los experimentos se realizaron tres veces.

B. RESULTADOS

Los porcentajes relativos de células de cáncer colorrectal que expresan LGR5 resultantes del cultivo de las células en las dos condiciones de cultivo se muestran en la figura 12. Para todas las estirpes celulares analizadas, el porcentaje de células que expresan LGR5 fue superior cuando las células se hicieron crecer como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia (barras negras) en comparación con el crecimiento en condiciones convencionales (barras grises). El patrón fue similar para células derivadas de estirpes celulares de cáncer colorrectal primario (HT29 y HCT116), así como estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico (SW620 y T84).

Las células CRC1, obtenidas de una biopsia de cáncer colorrectal primario humano, también expresaron LGR5 cuando se cultivaron en condiciones de cultivo de baja adherencia. Debido a que en este experimento particular las células CRC1 no se cultivaron de forma satisfactoria en condiciones adherentes convencionales, sin embargo, no fue posible comparar directamente el nivel de expresión de LGR5 cuando las células se cultivaron en condiciones adherentes frente a no adherentes.

Ejemplo 11: La expresión del gen de la gastrina se aumenta mediante el cultivo en condiciones de cultivo de baja adherencia de células de cáncer colorrectal

Este ejemplo describe el efecto sobre la expresión del gen de la gastrina en líneas de células del cáncer colorrectal primario y metastásico, así como células de una muestra de biopsia obtenida de cáncer colorrectal primario humano, cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia. Dichas condiciones de cultivo enriquecen las células madre del cáncer.

A. PROCEDIMIENTOS

Las células analizadas eran de las estirpes celulares de cáncer colorrectal primario HT29, HCT116, RKO, SW480 y DLD1 y de las estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico SW620 y T84. Se analizaron también células aisladas de una muestra de biopsia de un tumor colorrectal primario humano (CRC1). Las células se cultivaron en dos condiciones de cultivo diferentes. En primer lugar, las células se cultivaron en recipientes de cultivo convencionales para el crecimiento de células de mamífero, que promueven la unión celular a la superficie de plástico, tal como se ha descrito anteriormente. En segundo lugar, las células se cultivaron también en recipientes de cultivo de baja adherencia a los que las células de mamífero se unen normalmente de forma deficiente, como se ha descrito anteriormente. Después de un periodo de cultivo, las células se resuspendieron y se lisaron y el ARNm se aisló utilizando técnicas estándar. Después se midió la expresión del gen de la gastrina utilizando RT-PCR cuantitativa según técnicas estándar. Cada experimento se repitió tres veces.

B. RESULTADOS

Los niveles relativos de ARNm de gastrina expresados en las diferentes células analizadas en condiciones de cultivo convencionales y de baja adherencia se indican en la figura 13. Los niveles se normalizaron con respecto a la cantidad de ARNm de gastrina expresado en la estirpe celular de cáncer colorrectal primario RKO. Las células RKO expresan normalmente niveles bajos de progastrina. Nótese que los niveles de ARNm de gastrina relativos se indican en una escala logarítmica. Para todas las estirpes celulares analizadas, excepto las células RKO, la expresión del gen de gastrina fue superior, algunas veces muchas veces superior, cuando las células se cultivaron en condiciones de cultivo de baja adherencia (barras negras) en comparación con el cultivo en condiciones convencionales (barras grises). El patrón fue similar para células derivadas de estirpes celulares de cáncer colorrectal primario, así como estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico.

Ejemplo 12: Las células de cáncer colorrectal cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia expresan la proteína progastrina

Este ejemplo describe la expresión de proteína progastrina por parte de estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico, así como células de una muestra de biopsia obtenida de cáncer colorrectal primario humano, cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia. Dichas condiciones de cultivo enriquecen las células madre del cáncer.

A. PROCEDIMIENTOS

Las células analizadas eran de la estirpe celular de cáncer colorrectal primario y de las estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico SW620 y T84. Se analizaron también células aisladas de una muestra de biopsia de un tumor colorrectal primario humano (CRC1). Las células se cultivaron en recipientes de cultivo de baja adherencia en medio M11 (sin rojo de fenol). Después de 48 horas el medio se recogió, se centrifugó a 1.000 g durante 5 minutos para eliminar los desechos celulares y se congeló a 80ºC. Las células se disgregaron utilizando Accumax y se contaron. Para medir la progastrina secretada, el medio congelado se descongeló sobre hielo, y después se concentró 40 veces a un volumen de 500 µl por centrifugación a 2.500 g durante 45 minutos utilizando concentradores de proteína (Icon Pierce). La concentración de progastrina se midió después utilizando una técnica ELISA de tipo sándwich. Cada experimento se repitió dos veces.

B. RESULTADOS

La concentración de progastrina secretada en el medio de cultivo por las células de cáncer colorrectal después de 48 horas de cultivo en condiciones de cultivo de baja adherencia se muestra en la figura 14. Todas las células analizadas, incluidas una estirpe celular de cáncer colorrectal primario, dos estirpes celulares de cáncer colorrectal metastásico y células de una muestra de biopsia obtenidas a partir de cáncer colorrectal primario humano, segregaron progastrina cuando se cultivaron como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia. No obstante, las células SW620 secretaron sustancialmente menos progastrina que las otras estirpes celulares que se estudiaron. Los datos se expresan como concentración de progastrina en pM por millón de células por 48 horas de crecimiento.

Ejemplo 13: Efecto de anticuerpos policlonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer

colorrectal primario como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos policlonales anti-progastrina sobre el crecimiento como esferoides de estirpes celulares de cáncer colorrectal primario, así como células de una muestra de biopsia obtenida de cáncer colorrectal primario humano, cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia. Dichas condiciones de cultivo enriquecen las células madre del cáncer.

C. PROCEDIMIENTOS

Las células analizadas eran de estirpes celulares de cáncer colorrectal humano HT29 y HCT116, así como de células aisladas de una muestra de biopsia de un tumor colorrectal primario humano (CRC1). Las células se sembraron en pocillos de placas de 96 pocillos de baja adherencia (Corning) en medio M11 (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciproflaxina, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Para células HT29 y HCT116, se añadieron un total de 500 células en 100 □l a cada de los 3 pocillos por condiciones de tratamiento, mientras que para células CRC1 se añadieron 500 células en 100 □l a cada uno de los 10 pocillos por cada una de las condiciones de tratamiento. Cada 24 horas, las células se trataron con 3 □g/ml de anticuerpos anti-progastrina policlonales, o anticuerpo de control (IgG antihumana de ratón policlonal, Affinity BioReagents, Nº de ref. SA1-600). Después de 10 días de tratamiento para células HT29 y HCT116 y 14 días de tratamiento para células CRC1, se contó el número de esferoides celulares de cada pocillo y se calculó el promedio por pocillo. El técnico que realizó los experimentos estaba cegado con respecto al contenido de las soluciones de anticuerpos que se estaban analizando. Cada experimento se repitió dos veces.

D. RESULTADOS

Como se muestra en las figuras 15-17, en comparación con un anticuerpo de control, los anticuerpos policlonales anti-progastrina redujeron el número de esferoides celulares formados por células de cáncer colorrectal primario cultivadas en condiciones de cultivo de baja adherencia.

Ejemplo 14: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal primario como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento como esferoides de células positivas a LGR5 de dos estirpes celulares de cáncer colorrectal primario cuando se cultivan dichas células en condiciones de cultivo de baja adherencia. Dichas condiciones de cultivo enriquecen las células madre del cáncer.

A. PROCEDIMIENTOS

Las células eran de estirpes celulares de cáncer colorrectal primario HT29 y HCT116. Las células se seleccionaron en primer lugar por FACS (FACSaria, BD Biosciences) para aislar las que expresan el marcador de células madre de cáncer LGR5. Por FACS se seleccionaron 2 x 10^6 células HT29 y se seleccionaron 1 x 10^6 células HCT116. Las células se marcaron con 2 mg/1 x 10^6 células de un anticuerpo específico del extremo N-terminal de LGR5 (Abgent, Inc., Nº AP2745A). Después de FACS, las células positivas a LGR5 se plaquearon en 30 pocillos de placas de 96 pocillos de baja adherencia a una densidad de 10 células por pocillo en 100 µl de medio M11 (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciproflaxina, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Cada 24 horas durante 14 días, las células se trataron con 0,3 µg/ml de uno de dos anticuerpos monoclonales anti-progastrina diferentes (MAb2 y MAb3), o un anticuerpo monoclonal de control (IgG1 antihumana de ratón monoclonal, Calbiochem, Nº de ref. 411451). A la conclusión del tratamiento, se contó el número de esferoides celulares formado en presencia de cada tipo de anticuerpo. Las células se dejaron en cultivo 17 días adicionales, durante los cuales se refrescó el medio semanalmente sin tratamiento de anticuerpos adicional. El técnico que realizó los experimentos estaba cegado con respecto al contenido de las soluciones de anticuerpos que se estaban analizando.

B. RESULTADOS

Como se muestra en las figuras 18A y 19A, respectivamente, la capacidad de células positivas a LGR5 de dos estirpes celulares de cáncer colorrectal primario, HCT116 y HT29, para crecer como esferoides a lo largo de 14 días en cultivo de baja adherencia se redujo mediante el tratamiento con dos anticuerpos monoclonales separados contra progastrina, en comparación con un anticuerpo monoclonal de control.

Además, tal como se muestra en las figuras 18B y 19B, el número de esferoides no aumentó después de una incubación adicional de las células HCT116 y HT29 durante 17 días en cultivo en ausencia de antígenos añadidos exógenamente. Estos datos significan que se continuó con la supresión de la formación de esferas por los anticuerpos anti-hPG incluso después de eliminar los anticuerpos específicos.

Ejemplo 15: Efecto de anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal primario como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

Este ejemplo describe el efecto de cuatro anticuerpos monoclonales anti-progastrina diferentes sobre el crecimiento de esferoides de células CRC1 cuando dichas células se cultivaron en condiciones de cultivo de baja adherencia. Dichas condiciones de cultivo enriquecen las células madre del cáncer.

A. PROCEDIMIENTOS

Se obtuvieron células CRC1 de una biopsia de un carcinoma de colon humano según procedimientos estándar. Después de haberlas disociado en Accumax (Sigma) durante 45 minutos a 37ºC, las células se plaquearon en placas de 96 pocillos de baja adherencia (Corning) a una densidad de 100 células por pocillo en medio M11 (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciproflaxina, 5 µg/ml de gentamicina y 3 mg/ml de glucosa). Para cada brazo de tratamiento se utilizaron 10 pocillos.

Partiendo del primer día, las células se trataron dos veces diariamente con uno de cuatro anticuerpos monoclonales anti-progastrina diferentes, MAb5, MAb8, MAb13 o MAb16 (3 µg/ml) o la misma concentración de anticuerpo monoclonal P3X63Ag8 (ATCC, Ref TIB-9) o medio sin anticuerpos añadidos como controles. A continuación, el tratamiento se realizó una vez diariamente durante 8 días. Las esferas se fotografiaron diariamente para realizar el recuento subsiguiente. Todos los experimentos se llevaron a cabo en forma cegada. Después de la conclusión del experimento, se contó el número de esferas de cada tipo de tratamiento.

B. RESULTADOS

Los resultados se muestran en la figura 20. Cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-hPG analizado fue eficaz para reducir el número de esferoides formado por las células de cáncer colorrectal primario en condiciones de cultivo de baja adherencia. En comparación con un anticuerpo monoclonal no específico y medio solo, el efecto inhibidor de todos los anticuerpos analizados era estadísticamente significativo a $p < 0,05$ utilizando el ANOVA de una vía con análisis post-hoc de Bonferroni. MAb5, MAb8 y MAb13 reconocen, todos, epítopos C-terminales de hPG, mientras que MAb16 se une a un epítopo N-terminal de hPG.

Ejemplo 16: Efecto de un anticuerpos monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal primario como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

Este ejemplo describe el efecto de un anticuerpo monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento como esferoides de células positivas a ALDH1 de una estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico cuando se cultivan dichas células en condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. PROCEDIMIENTOS

Las células analizadas eran de la línea de cáncer colorrectal metastásico T84. Las células se clasificaron en primer lugar por FACS (FACSaria, BD Biosciences) para aislar las que expresan el marcador de células madre de cáncer ALDH1 utilizando un kit ALDEFLUOR (Stemcell Technologies). Después de FACS, las células positivas a ALDH1 (es decir, aquellas que mostraban actividad enzimática con ALDH1 detectable) se plaquearon en pocillos de placas de 96 pocillos de baja adherencia a una densidad de 100 células por pocillo en 100 µl de medio M11 (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 100 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciproflaxina, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Cada 24 horas durante 11 días, las células se trataron con una de tres concentraciones diferentes (0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml o 1 µg/ml) de un anticuerpo monoclonal anti-progastrina (MAb3) o 1 µg/ml de un anticuerpo monoclonal de control (IgG1 antihumana de ratón monoclonal, Calbiochem, Nº de ref. 411451). A la conclusión del tratamiento, se contó el número de esferoides celulares formado en presencia de cada anticuerpo. El técnico que realizó los experimentos estaba cegado sobre los contenidos de las soluciones de anticuerpos que se estaban analizando.

B. RESULTADOS

Como se muestra en la figura 21, la capacidad de células positivas a ALDH1 de la estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico T84 para crecer como esferoides en cultivo de baja adherencia se redujo de una forma dependiente de la dosis mediante el tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra progastrina, en comparación con un anticuerpo monoclonal de control.

Ejemplo 17: Efecto del pretratamiento con anticuerpos monoclonales anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal primario como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

Este ejemplo describe el efecto del pretratamiento utilizando cuatro anticuerpos monoclonales antiprogastrina

diferentes sobre el crecimiento de células CRC1 positivas a ALDH1 en condiciones de cultivo convencionales y el crecimiento como esferoides cuando las células se transfirieron a condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. PROCEDIMIENTOS

Se obtuvieron células CRC1 de una biopsia de carcinoma de colon humano según procedimientos estándar. Después de disociarlas en Accumax (Sigma) durante 45 minutos a 37ºC, las células CRC1 (100.000 células/pocillo) se cultivaron en condiciones de cultivo adherentes convencionales en medio DMEM carente de suero durante 72 horas en presencia o ausencia de los anticuerpos monoclonales anti-hPG MAb5, MAb8, MAb13 o MAb16. Los experimentos se llevaron a cabo en forma cegada.

Al final del periodo de tratamiento, se realizaron dos ensayos diferentes sobre las células. En primer lugar, el porcentaje de células que expresaban ALDH1, un marcador de células madre de cáncer colorrectal, determinado por FACS. En el segundo ensayo, para cada grupo de tratamiento, se plaquearon 200 células/pocillo en seis pocillos de una placa de 24 pocillos de baja adherencia en 500 µl de medio M11 carente de suero suplementado con bPGF y EGF y se cultivaron durante 7 días sin tratamiento adicional. Al final de este periodo, se tomaron fotografías, se contó el número de esferas por pocillo y se midió el área superficial de las esferas.

B. RESULTADOS

Los resultados se muestran en la figura 22 y la figura 23. Cada uno de los cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG analizados era eficaz después de tres días en cultivo adherente convencional para reducir el número de células de cáncer colorrectal primario CRC1 que expresan ALDH1 en comparación con un control. Cada uno de estos anticuerpos era también eficaz para reducir el número de esferoides formados por células de cáncer colorrectal primario en condiciones de cultivo de baja adherencia después de retirar los anticuerpos y cultivar las células durante 7 días adicionales. En comparación con el control, el efecto inhibidor de MAb5, MAb8 y MAb16 fue estadísticamente significativo a $p < 0,05$ utilizando el ANOVA de una vía con análisis de Bonferroni post-hoc. Aunque MAb13 también redujo el número de esferoides en comparación con el control, el efecto no alcanzó significancia estadística.

Ejemplo 18: Efecto del pretratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento de células de cáncer colorrectal metastásico como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia

Este ejemplo describe el efecto del pretratamiento utilizando un anticuerpo monoclonal anti-progastrina sobre el crecimiento como esferoides de células positivas a ALDH1 de una estirpe celular de cáncer colorrectal metastásico cuando se cultivan dichas células en condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. PROCEDIMIENTOS

Las células analizadas eran de las líneas de cáncer colorrectal metastásico T84 y SW620. Las células se cultivaron en primer lugar en recipientes de cultivo adherentes convencionales durante 72 horas en presencia del anticuerpo monoclonal anti-progastrina MAb3 (1 µg/ml), un anticuerpo monoclonal de control, el agente quimioterápico 5-fluorouracilo (5FU 10 µM), o el disolvente dimetilsulfóxido (DMSO). Después del tratamiento, las células se sometieron a dos ensayos. En el primero, el porcentaje de células positivas para el marcador de células madre de cáncer ALDH1 se determinó utilizando un kit ALDEFLUOR (Stemcell Technologies). En el segundo ensayo, para cada grupo de tratamiento, las células se plaquearon en seis pocillos de placas de 96 pocillos de baja adherencia a una densidad de 500 células por pocillo en 100 µl de medio carente de suero que contenía bPGF y EGF y se cultivaron durante 11 días sin tratamiento adicional. Al final de este periodo, se contó el número de esferoides por pocillo.

B. RESULTADOS

Como se muestra en la figura 24 y la figura 25, respectivamente, el número de células de cáncer colorrectal metastásico T84 y SW620 positivas a ALDH1 se redujo como resultado del pretratamiento durante 72 horas con anticuerpo monoclonal anti-progastrina MAb3, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo monoclonal de control.

Como se muestra en la figura 26 y la figura 27, respectivamente, la capacidad de las células de cáncer colorrectal metastásico T84 y SW620 para crecer como esferoides en cultivo de baja adherencia se redujo mediante el pretratamiento durante 72 horas con un anticuerpo monoclonal contra progastrina en comparación con un anticuerpo monoclonal de control.

Ejemplo 19: Los anticuerpos anti-progastrina reducen la iniciación de nuevos tumores *in vivo*

Este ejemplo describe el efecto de anticuerpos monoclonales específicos para progastrina humana sobre la

capacidad de células aisladas de cáncer colorrectal metastásico humano cultivado en ratones atímicos para formar nuevos tumores después del trasplante.

A. PROCEDIMIENTOS

Utilizando técnicas estándar, se administró a ratones atímicos BALBc inyecciones intraesplénicas de células de cáncer colorrectal SW620 humano metastásico. A los ratones se les administró después el anticuerpo monoclonal anti-hPG MAb3 o un anticuerpo monoclonal de control dos veces por semana durante un total de seis semanas. Para cada anticuerpo, la dosis fue de 8 mg/kg. Al final del periodo de tratamiento se diseccionó tejido de metástasis de los ratones tratados y de los de control. Las células tumorales se disgregaron mediante tratamiento del tejido diseccionado con Accumax, se filtraron y se contaron. Se obtuvo un total de 23.800 células de tumor viables a partir de tejido metastásico de los ratones tratados con MAb3, y se obtuvieron 36.400 de ratones de control.

Las células aisladas se analizaron después para determinar si mostraban características fenotípicas de células madre de cáncer analizando si las células podían crecer como esferoides en condiciones de cultivo de baja adherencia y si podían iniciar nuevos tumores cuando se trasplantan a nuevos huéspedes. Para el ensayo de esferoides, tanto para las células tratadas como las de control, se sembraron 2.000 células/pocillo en cinco pocillos de recipientes de cultivo de baja adherencia en medio M11 suplementado con bFGF y EGF. Las células se cultivaron durante siete días y después se contó el número de esferoides que se formó en cada pocillo. Para el ensayo de trasplante, los esferoides que se desarrollaron a partir de células aisladas de metástasis tratada y de control se juntaron, se disgregaron y se contaron. Se obtuvieron un total de 20.000 de esferoides derivados de metástasis tratadas y se obtuvieron 110.000 células de esferoides derivados de metástasis de control. Después se trasplantaron a dos nuevos ratones atímicos BALBc un número igual de células tratadas o de control. Específicamente, se inyectaron por vía subcutánea en el muslo izquierdo de los ratones 6.500 células tumorales derivadas de metástasis tratada, mientras que se inyectó el mismo número de células de control por vía subcutánea en el muslo derecho. De esta forma, cada ratón sirvió como su propio control. Después se calculó en volumen del tumor a lo largo del tiempo en los dos animales.

B. RESULTADOS

Como se muestra en la figura 28, el crecimiento de esferoides en cultivo de baja adherencia de células de cáncer colorrectal metastásico humano aisladas de metástasis *in vivo* se redujo tratando los animales con el anticuerpo monoclonal antiprogastrina MAb3 en comparación con el tratamiento con la misma dosis de un anticuerpo monoclonal de control.

Como se muestra en la figura 29, la capacidad para iniciar el crecimiento de un nuevo tumor después de trasplante de células de cáncer colorrectal metastásico aisladas de metástasis *in vivo* se redujo también tratando las células con el anticuerpo monoclonal antiprogastrina MAb3 en comparación con el tratamiento con la misma dosis de un anticuerpo monoclonal de control. En el gráfico, el eje Y corresponde al volumen del tumor en mm^3. Los cuadrados con relleno representan puntos de datos de volumen de tumor para uno de los ratones desnudos a los que se inyectó por vía subcutánea células de cáncer colorrectal metastásico derivadas de metástasis que crecieron en ratones tratados con un anticuerpo monoclonal de control. Inversamente, los cuadrados sin relleno representan datos de puntos para el mismo ratón al que se inyectaron en el muslo opuesto células de cáncer colorrectal metastásico derivadas de metástasis que crecieron en ratones tratados con el anticuerpo monoclonal anti-progastrina MAb3. Los diamantes con relleno y sin relleno corresponden a datos similares recogidos del segundo ratón atímico utilizado en el experimento.

Ejemplo 20: Cuantificación de niveles de PG en plasma o suero

Los niveles de PG en plasma y/o suero pueden determinarse de forma conveniente 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 lecha secada 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 liofilizado diluido 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 37ºC, o como alternativa entre 12 y 16 horas a 21ºC. 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 monoclonal N-terminal 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 21ºC. Las placas se lavan después tres veces en PBS-Tween (0,05%) y se añade sustrato HRP durante 15 minutos a 21ºC. La reacción se detiene mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 M y se lleva a cabo una medición 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 a partir del patrón de referencia de hPG.

Ejemplo 21: Ensayo ELISA para evaluar la especificidad de anticuerpos anti-hPG

La especificidad de anticuerpos anti-hPG puede determinarse convenientemente utilizando un ensayo ELISA de la forma siguiente. Se incuban placas de 96 pocillos durante toda la noche a 4ºC 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 22ºC 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 (a 0,3 a 1 ng/ml) en PBS y el 0,1% de Tween-20. Después las placas se incuban durante 2 horas a 22ºC, 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 oscuridad durante 20 minutos a 22ºC. 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 en 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.

Ejemplo 22: 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. Se siembran células de cáncer colorrectal en una placa de 6 pocillos, a aproximadamente de 50.000 a 100.000 células por pocillo. Las células se tratan después a intervalos de 12 horas durante 48 horas con el anticuerpo anti-hPG de ensayo o un anticuerpo de control, a concentraciones de 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 en un anticuerpo no específico de control, utilizando un ensayo de Mann-Whitney de dos colas (con diferencias consideradas como significativas cuando $p<0,05$). Los números de células totales se corrigieron para el número de células al comienzo del periodo de tratamiento, denominado T_0. Las células de cáncer colorrectal ejemplificativas para su utilización en este ensayo incluyen, pero sin limitación, las estirpes celulares de cáncer colorrectal primario y metastásico divulgadas en la presente memoria.

Ejemplo 23: Ensayo para evaluar la afinidad de un anticuerpo anti-hPG

Las constantes de afinidad de anticuerpos anti-hPG pueden medirse utilizando la técnica del proteón (BioRad), según Nhshol *et al.*, 2008, Analytical Biochemistry 383:52-60. En síntesis, para anticuerpos anti-PG murinos, se recubre en primer lugar un chip sensor con un anticuerpo de IgG antirratón (50 µg/ml), asegurando que la señal detectada por el chip después de la inyección del anticuerpo se reduce entre 10.000 y 11.500 unidades de respuesta (RU). El anticuerpo anti-hPG murino de interés (anticuerpo de ensayo) se inyecta después (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 variedad 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 línea base 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 (K_D) se calculan como la relación entre la constante de disociación (k_d) y la constante de asociación (k_a). Los valores experimentales pueden validarse analizando la similitud estadísticamente

relevante entre curvas experimentales basadas en mediciones de unión y perfiles teóricos.

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

Ejemplo 24: Ensayo para evaluar la unión competitiva con un anticuerpo anti-hPG de referencia

Puede realizarse un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo de interés (anticuerpo de ensayo) compite por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado de la forma siguiente. Se recubren placas de 96 pocillos con un anticuerpo anti-hPG de captura (anticuerpo policlonal o monoclonal que reconoce una región N-terminal o C-terminal de hPG que difiere del epítopo reconocido por el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), a una concentración que se elegirá dentro del intervalo de 1-10 µg/ml, durante toda la noche a 4ºC (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 22ºC, 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 22ºC. A continuación se añade el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado (o una mezcla que contiene el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), junto con concentraciones crecientes de anticuerpo de ensayo sin marcar, y se incuba durante 1 h a 22ºC. 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 22ºC, 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.

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 epítopo, o a un epítopo 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.

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

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 epítopo que el anticuerpo anti-hPG de referencia.

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

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

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.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR EL CÁNCER COLORRECTAL

<130> N.112749

<150> 61/293.612
<151> 08/01/2010

<150> 61/367.855
<151> 26/07/2010

<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

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

<400> 2

Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser
1 5

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 3

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr
1 5

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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

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

<400> 5

Lys Val Ser
1

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 9

Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 10

Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 11

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 12
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 12

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

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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
```

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
```

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

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
<213> Secuencia artificial

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

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

<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
```

<210> 17
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<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
    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
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)

<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
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

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

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

<400> 20

```
Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly
1               5                  10                  15

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

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

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

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

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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
```

<210> 23

<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 24

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30
```

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (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
```

<210> 27
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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
```

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

<400> 28

Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

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

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

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

<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

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Phe Gly Arg Arg
1

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Asp Phe Gly Arg
1 5

<210> 35
<211> 5

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Glu Asp Glu Asn
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 38

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 39

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 40

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 41

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 42

Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 43

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr
1 5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 44

Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr
1 5

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

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

<400> 45

Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe
1 5 10

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 46

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr
1 5

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 47

Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 48

Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 49

Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 50

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 51

Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
1 5

<210> 52
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 52

Gln Met Ser
1

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

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

<400> 53

Leu Val Ser
1

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 54

Val Lys Lys Asp Gly Ser His
1 5

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

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

<400> 55

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 56

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 57

Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 59
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 61
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 63

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

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

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

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

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

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

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110
```

<210> 64
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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
```

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Leu
        115
```

<210> 67
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<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
```

<210> 68
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

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

<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
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

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

<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
```

<210> 70
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<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
```

```
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 Lle Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 71
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

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

<400> 71

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

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

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

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

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

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

cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa      336

 Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
            100                 105                 110
```

<210> 72
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

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

<400> 72

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

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

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

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

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

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

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

<210> 73
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

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

<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
```

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

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

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

<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
```

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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
```

<210> 76
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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

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
<213> Secuencia artificial

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

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

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

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

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 79

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 80
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 80

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser
```

<210> 81
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

<210> 82
<211> 114
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser
```

<210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 83

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

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

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

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

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

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

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

<210> 84
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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
```

<210> 85
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 86

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 87
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
```

<210> 88
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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
```

<210> 89
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

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
<213> Secuencia artificial

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

<400> 90

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 91
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

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
<211> 121

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 93
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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

<210> 94
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 94

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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<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

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

<210> 97
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)

<223> Xaa es un residuo modificado ácido aminohexanoico

<400> 97

Cys Xaa Xaa Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn
1 5 10

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

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

<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>
<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

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

<400> 100

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

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

<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 Glu
50 55 60

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

<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

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

<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
<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

Phe

<210> 105
<211> 18
<212> PRT
<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

<210> 106
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106

Ser Ala Glu Asp Glu Asn
1 5

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la progastrina humana para la utilización en la prevención o la prevención de la recurrencia o el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico,

en la que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 1, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 2, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 3, y una región variable de cadena ligera en la que la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 4, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 5, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 6.

2. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-progastrina humana se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos camelizados, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.

3. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está conjugado a una fracción.

4. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo presenta una afinidad de unión a progastrina comprendida entre 10^{-6} M y 10^{-12} M.

5. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 12, y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 13.

6. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es quimérico.

7. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está humanizado.

8. Composición para la utilización según la reivindicación 7, en la que dicho anticuerpo comprende 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.

9. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el cáncer colorrectal metastásico está ubicado en el hígado, pulmón, cerebro o los ganglios linfáticos.

10. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición se adiministra antes de o tras la resección quirúrgica de un tumor colorrectal metastásico.

11. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición se administra antes de o tras la administración de una dosis de radioterapia de un tumor colorrectal metastásico.

12. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición se administra antes de, concurrentemente a o tras la administración de un agente quimioterápico para tratar un tumor colorrectal metastásico.

13. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición se administra antes de, simultáneamente a o tras la administración de un segundo anticuerpo terapéutico con especificidad distinta a la de por la progastrina.

14. Composición para la utilización según la reivindicación 13, en la que el segundo anticuerpo se une específicamente a VEGF o EGFR.

15. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que la composición comprende una pluralidad de anticuerpos que presentan unas especificidades por epítopos distintos de la progastrina.

16. Composición para la utilización según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-progastrina humana se administra a una dosis de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg.

17. Composición para la utilización según la reivindicación 16, en la que la dosis del anticuerpo anti-progastrina humana se administra durante una pluralidad de administraciones espaciadas temporalmente.

FIG. 1

ARNm de GAST en líneas celulares CRC primarias y metastásicas

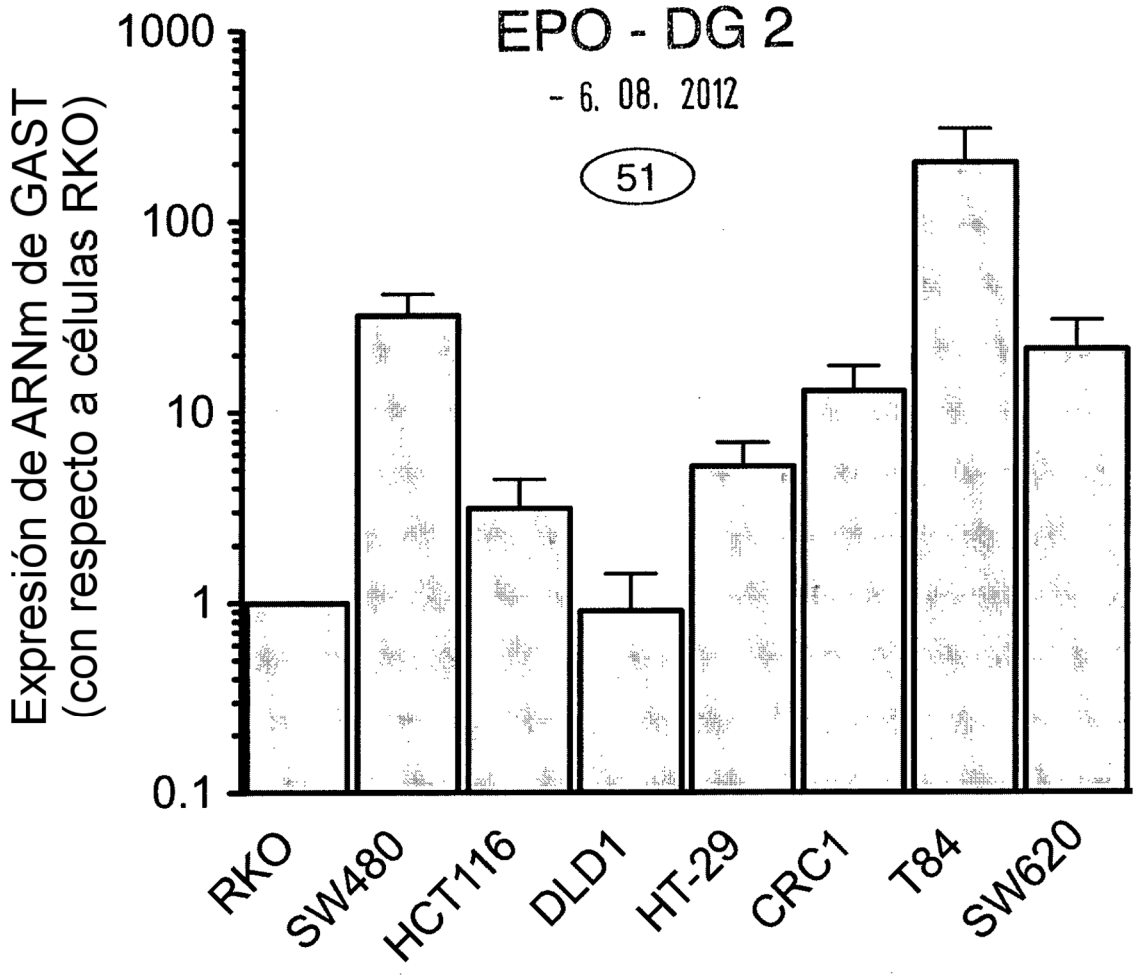


FIG. 2

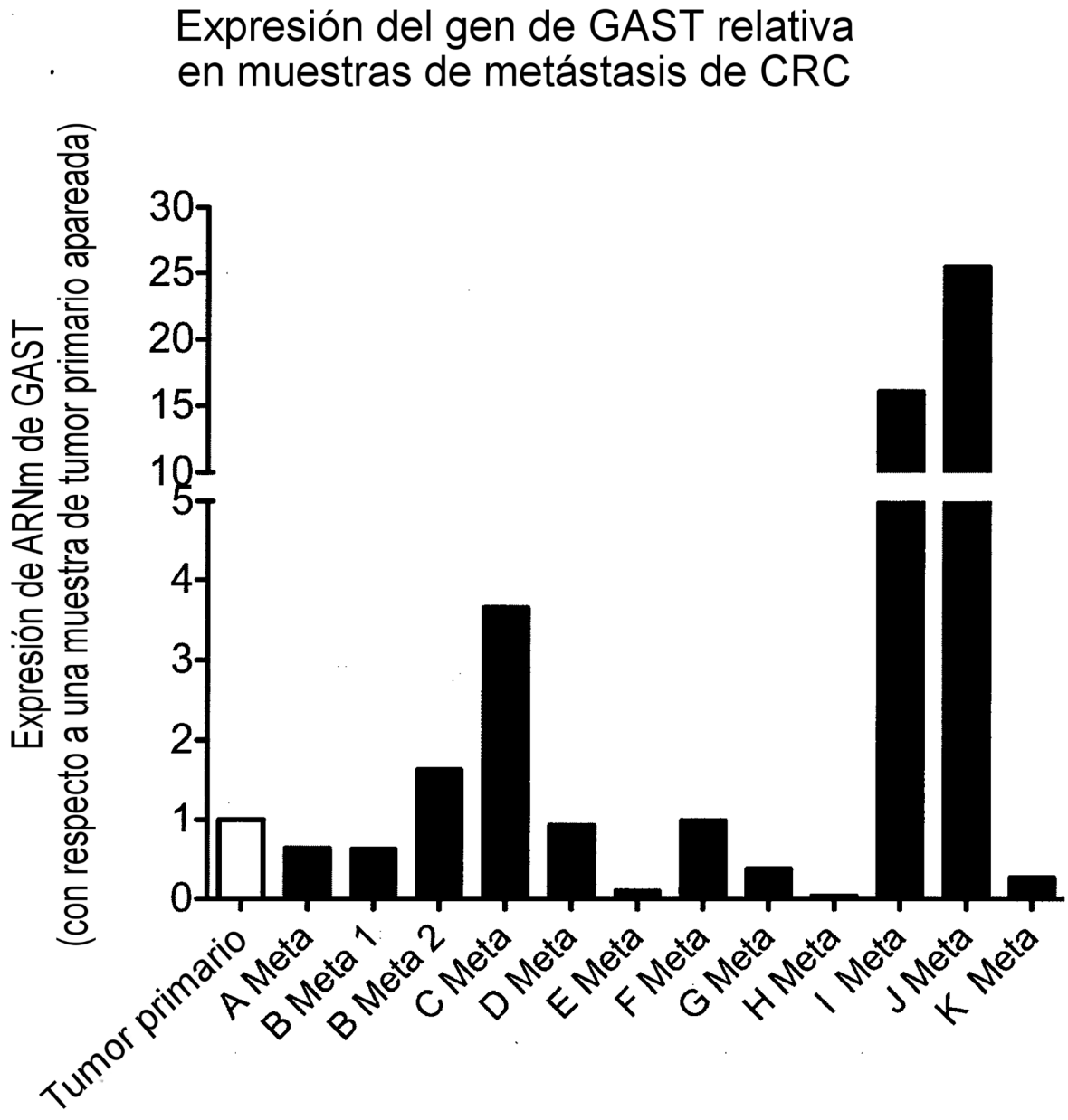

Expresión del gen de GAST relativa
en muestras de metástasis de CRC
Expresión de ARNm de GAST
(con respecto a una muestra de tumor primario apareada)
30
25
20
15
10
5
4
3
2
1
0
Tumor primario
A Meta
B Meta 1
B Meta 2
C Meta
D Meta
E Meta
F Meta
G Meta
H Meta
I Meta
J Meta
K Meta

FIG. 3

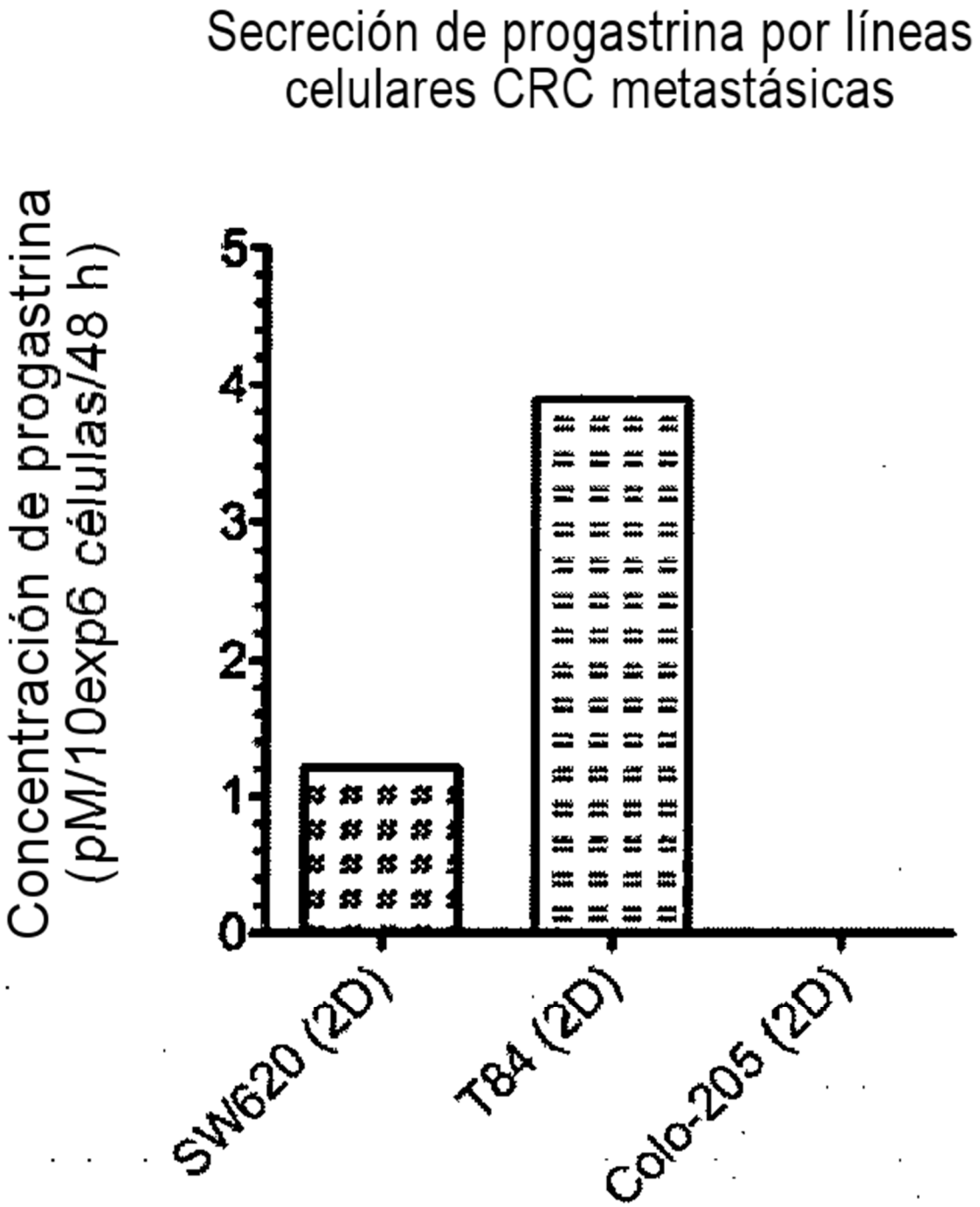

Secreción de progastrina por líneas celulares CRC metastásicas
Concentración de progastrina (pM/10exp6 células/48 h)
0
1
2
3
4
5
SW620 (2D)
T84 (2D)
Colo-205 (2D)

FIG. 4

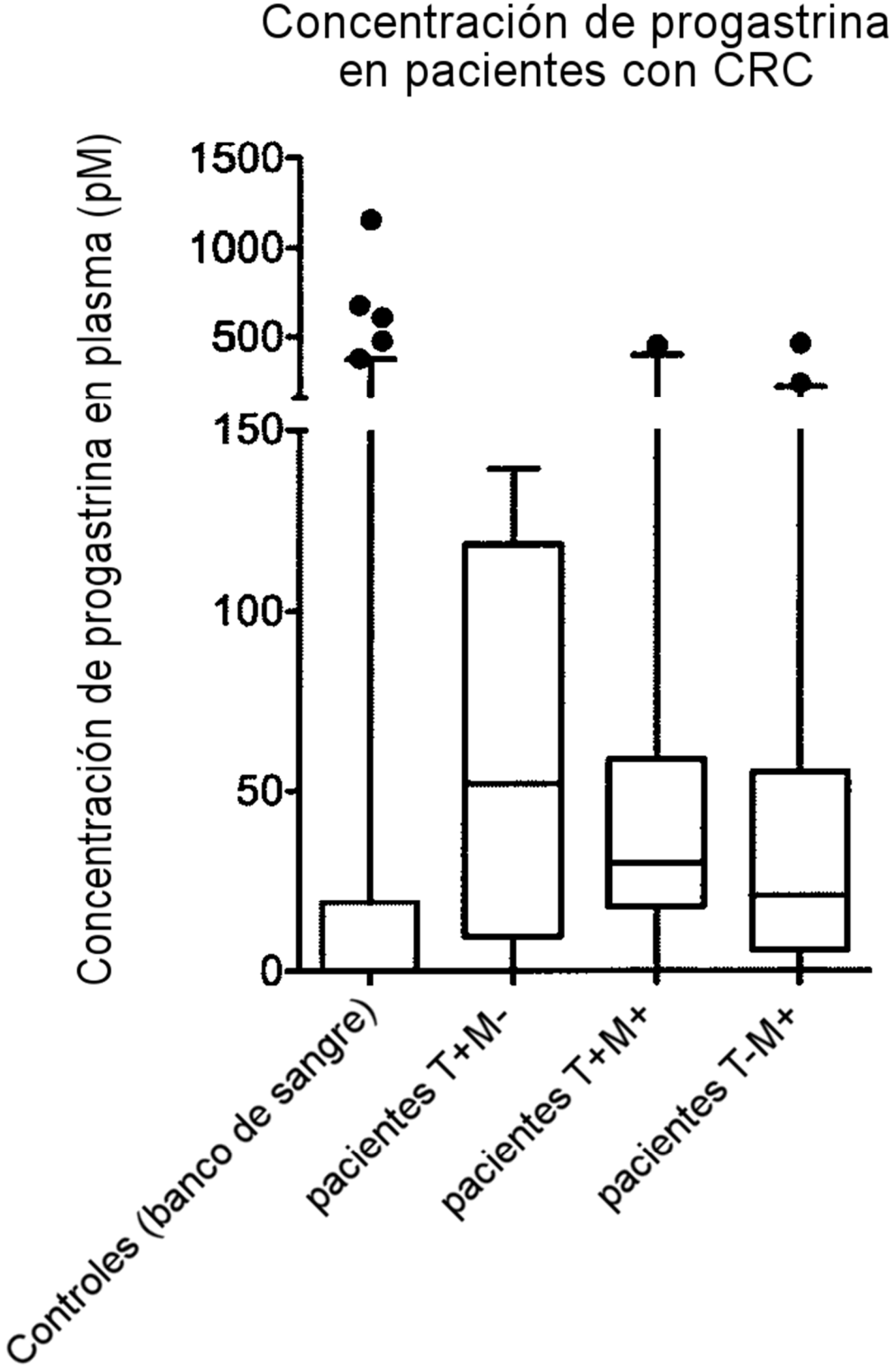

Concentración de progastrina en pacientes con CRC
Concentración de progastrina en plasma (pM)
1500
1000
500
150
100
50
0
Controles (banco de sangre)
pacientes T+M-
pacientes T+M+
pacientes T-M+

FIG. 5

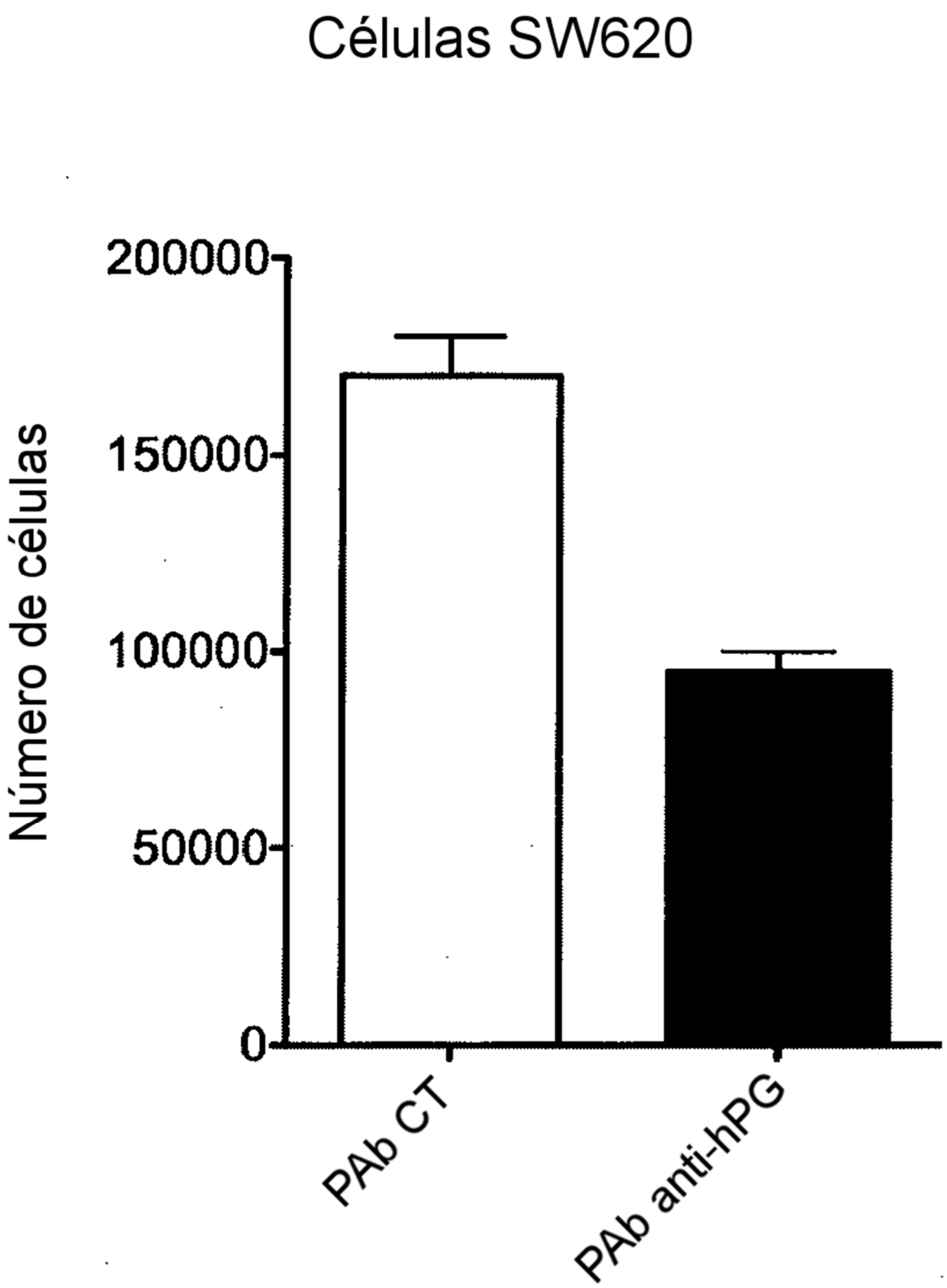

Células SW620
Número de células
200000
150000
100000
50000
0
PAb CT
PAb anti-hPG

FIG. 6A

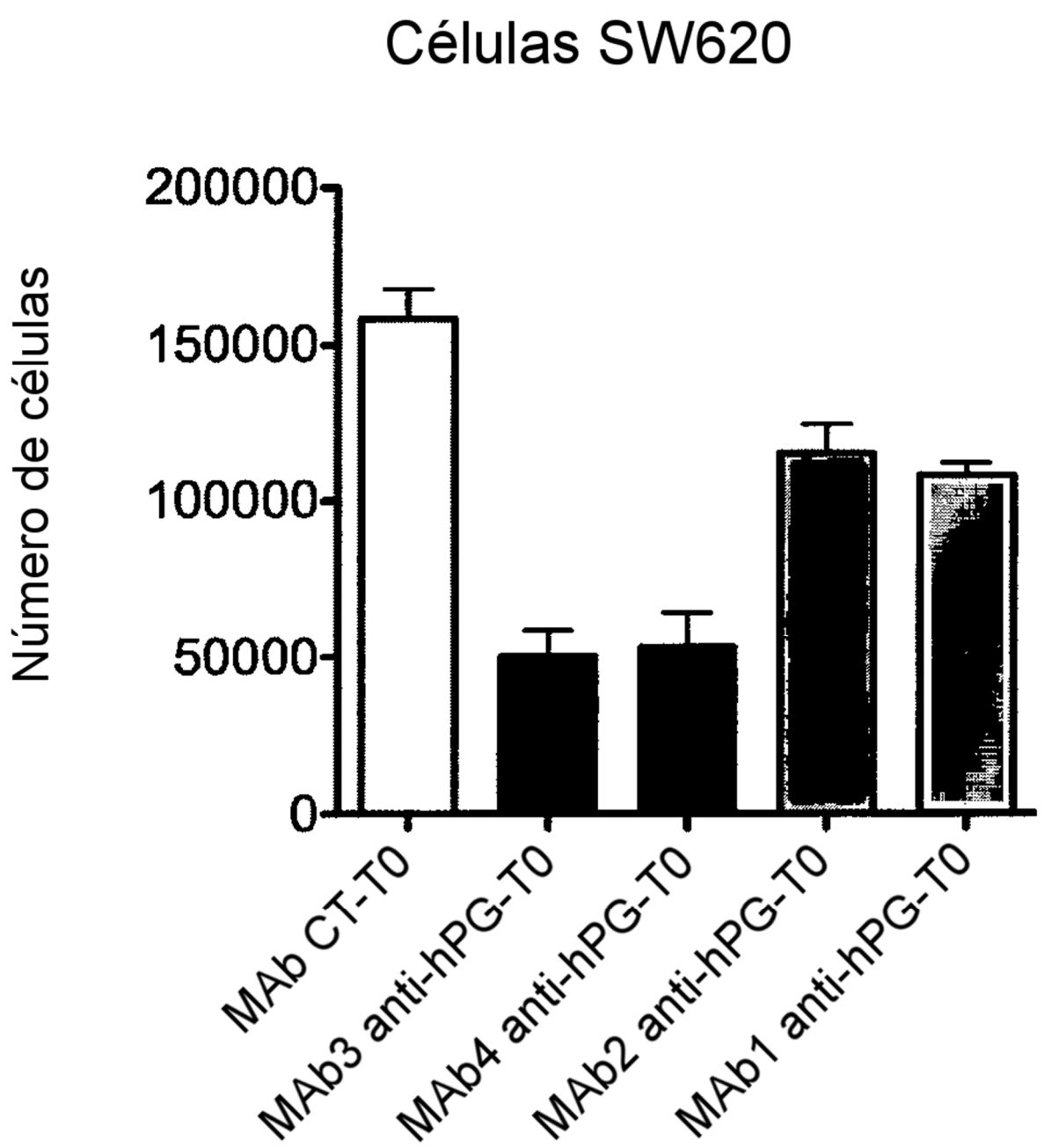

Células SW620
Número de células
200000
150000
100000
50000
0
MAb CT-T0
MAb3 anti-hPG-T0
MAb4 anti-hPG-T0
MAb2 anti-hPG-T0
MAb1 anti-hPG-T0

FIG. 6B

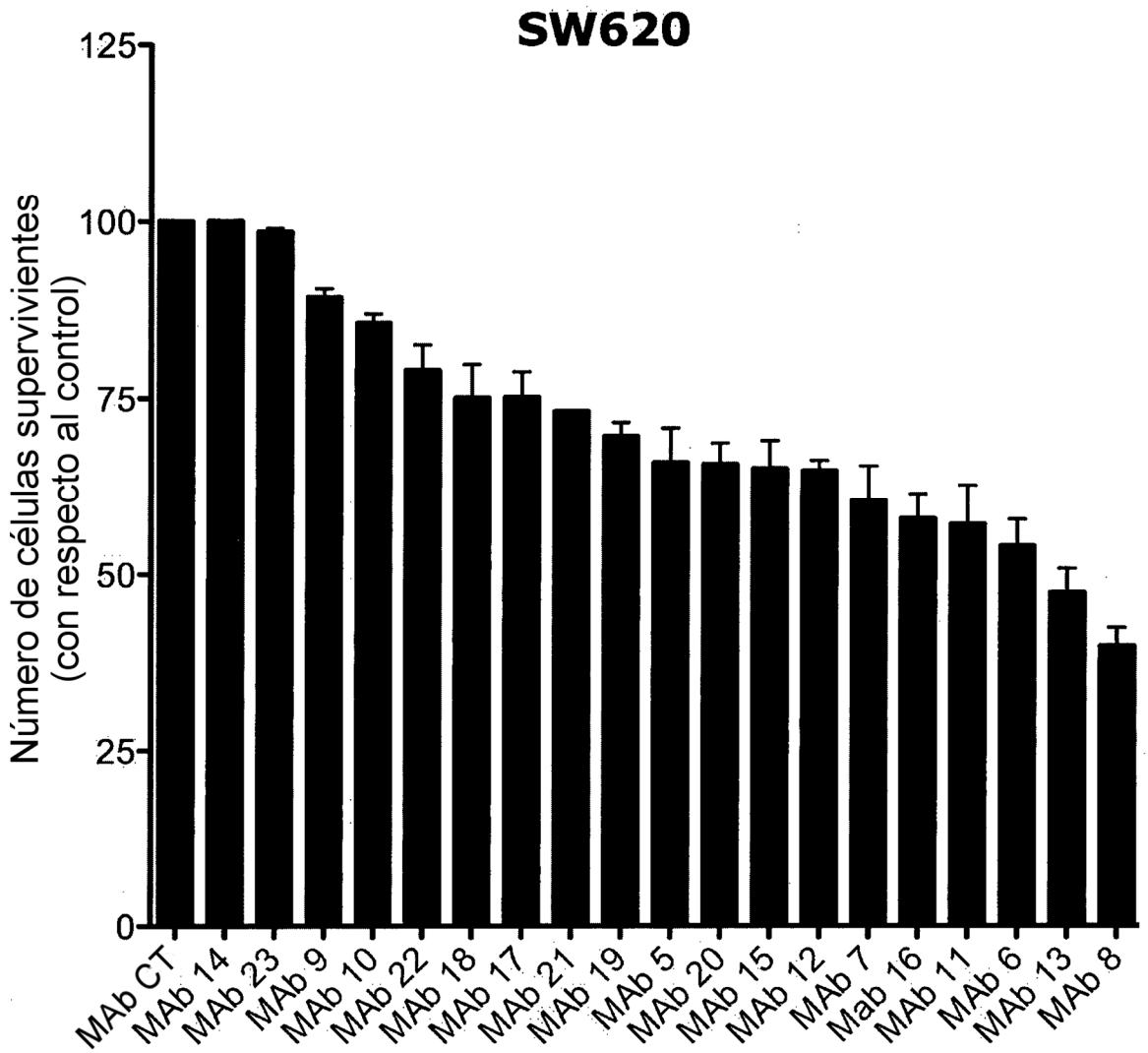

SW620
Número de células supervivientes (con respecto al control)
125
100
75
50
25
0
MAb CT
MAb 14
MAb 23
MAb 9
MAb 10
MAb 22
MAb 18
MAb 17
MAb 21
MAb 19
MAb 5
MAb 20
MAb 15
MAb 12
MAb 7
Mab 16
MAb 11
MAb 6
MAb 13
MAb 8

FIG. 7

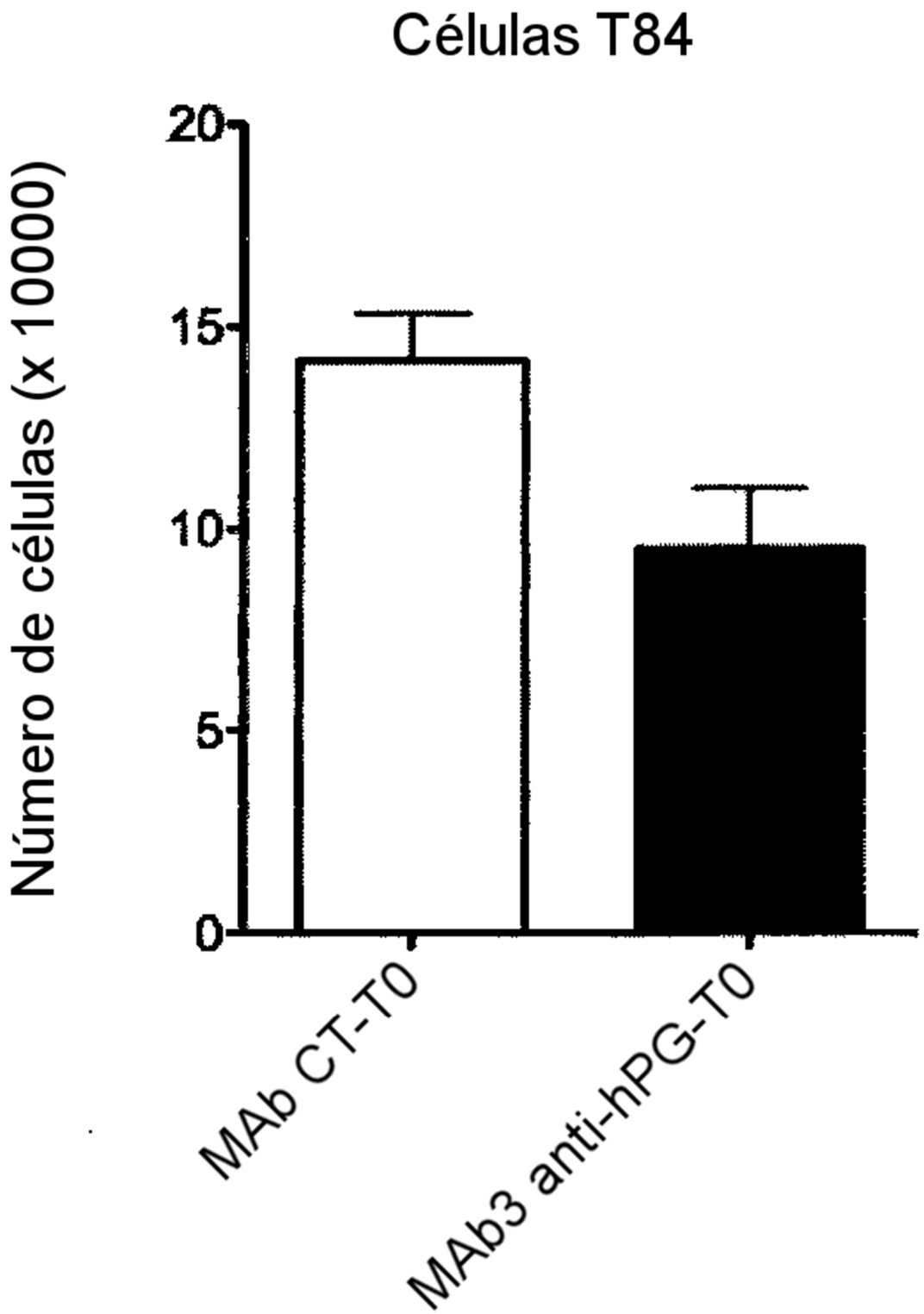

Células T84
Número de células (x 10000)
20
15
10
5
0
MAb CT-T0
MAb3 anti-hPG-T0

FIG. 8A

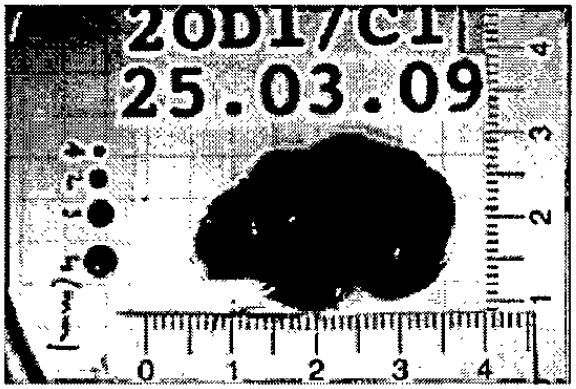


FIG. 8B

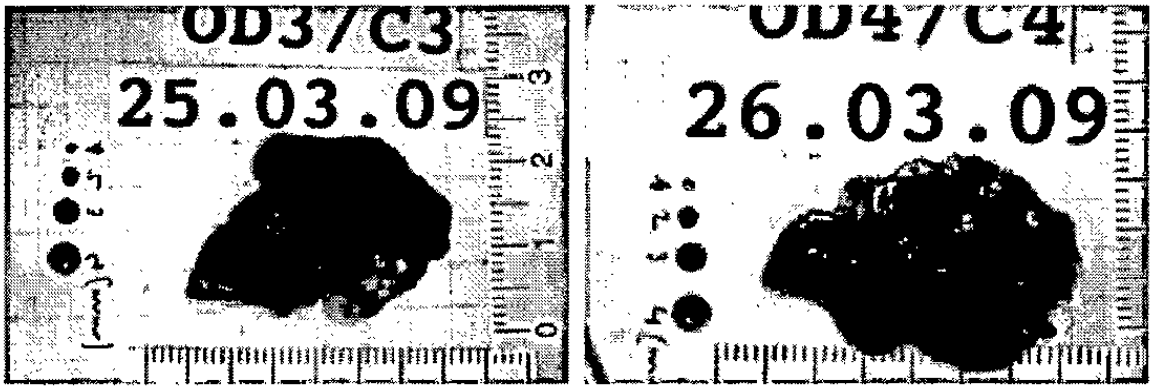


FIG. 9

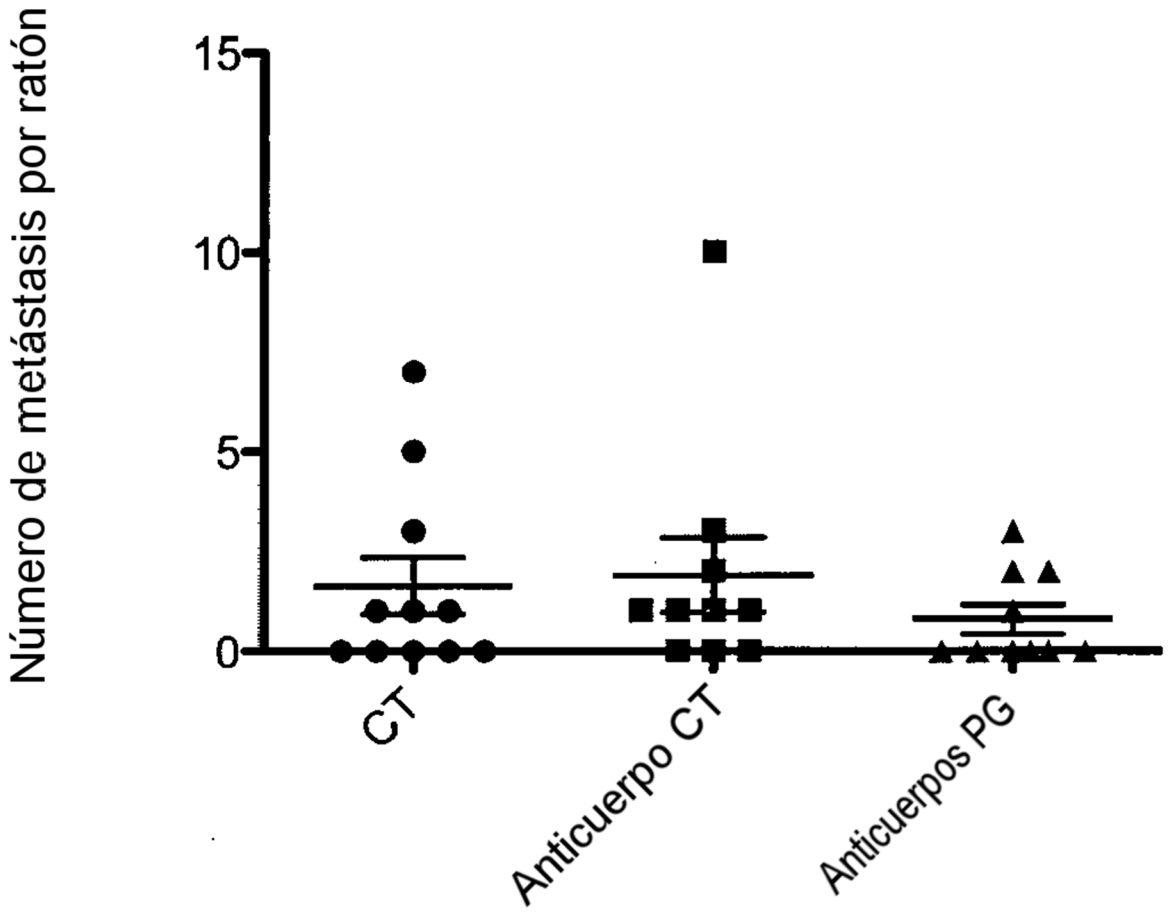

Número de metástasis por ratón
15
10
5
0
CT
Anticuerpo CT
Anticuerpos PG

FIG. 10

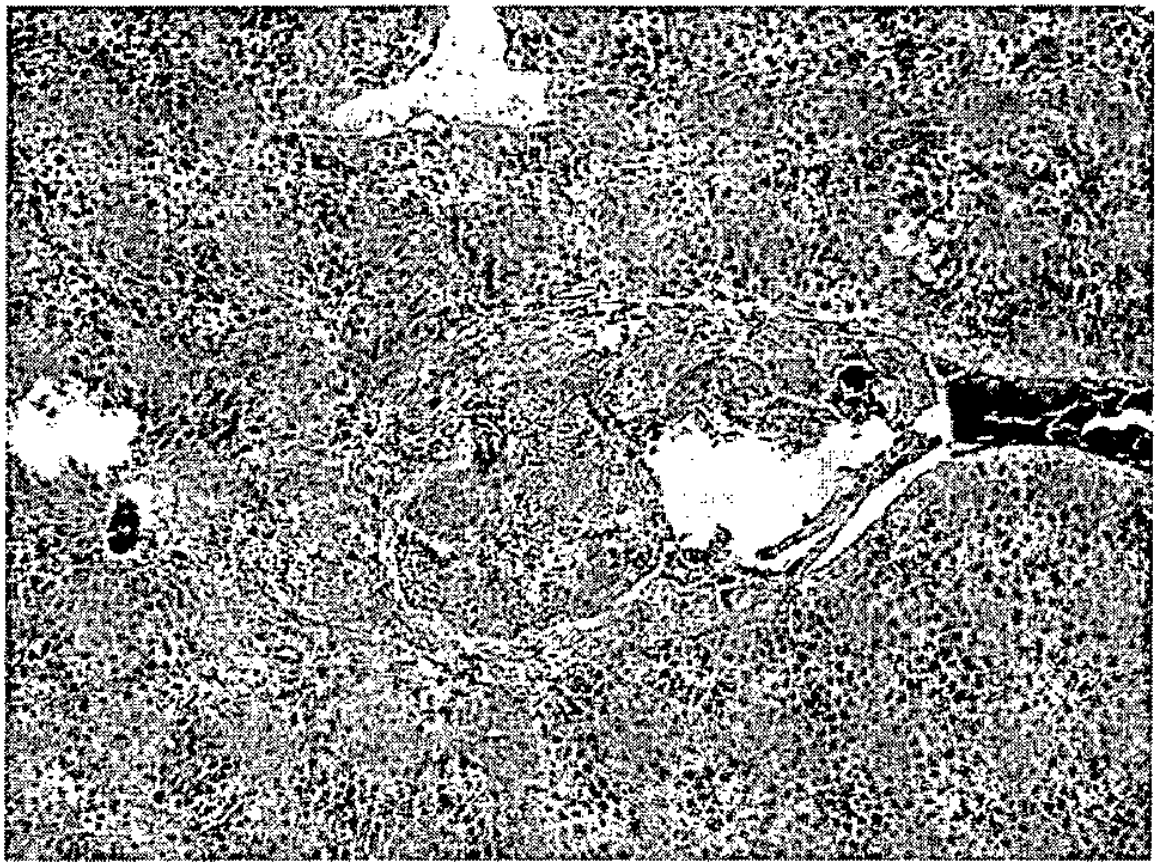
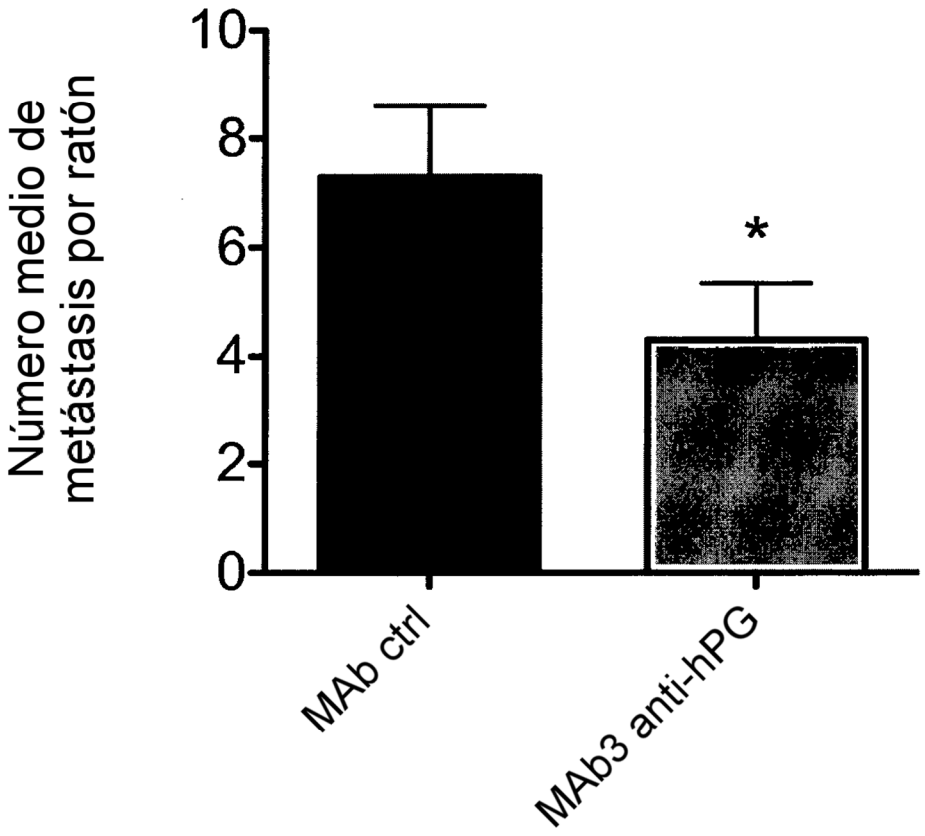


FIG. 11



*p=0,0372, ensayo de Mann-Whitney, n=10 por grupo

FIG. 12

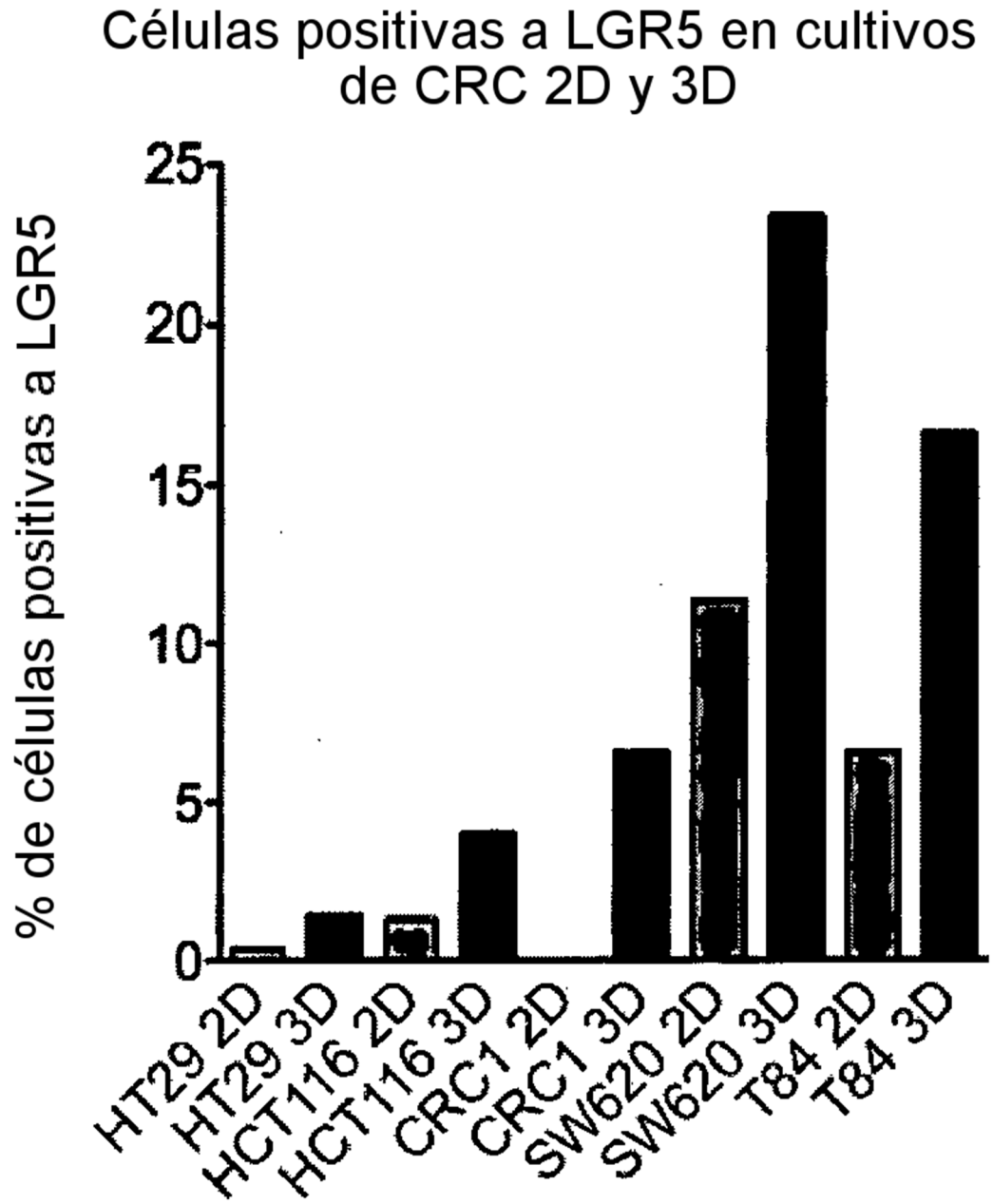

Células positivas a LGR5 en cultivos de CRC 2D y 3D
% de células positivas a LGR5
25
20
15
10
5
0
HT29 2D
HT29 3D
HCT116 2D
HCT116 3D
CRC1 2D
CRC1 3D
SW620 2D
SW620 3D
T84 2D
T84 3D

FIG. 13

Expresión del gen que codifica la progastrina en células CRC primarias y metastásicas cultivadas en 2D y 3D

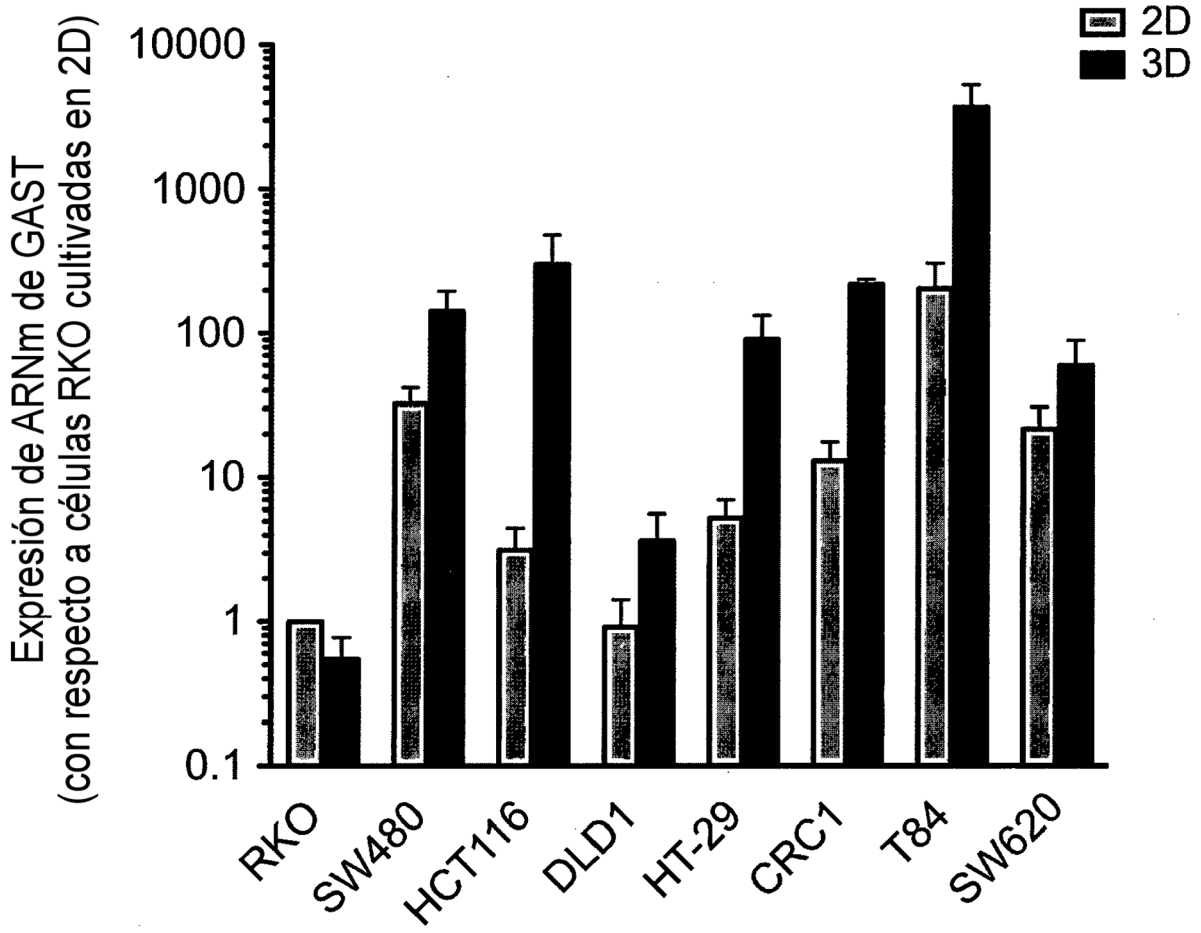


FIG. 14

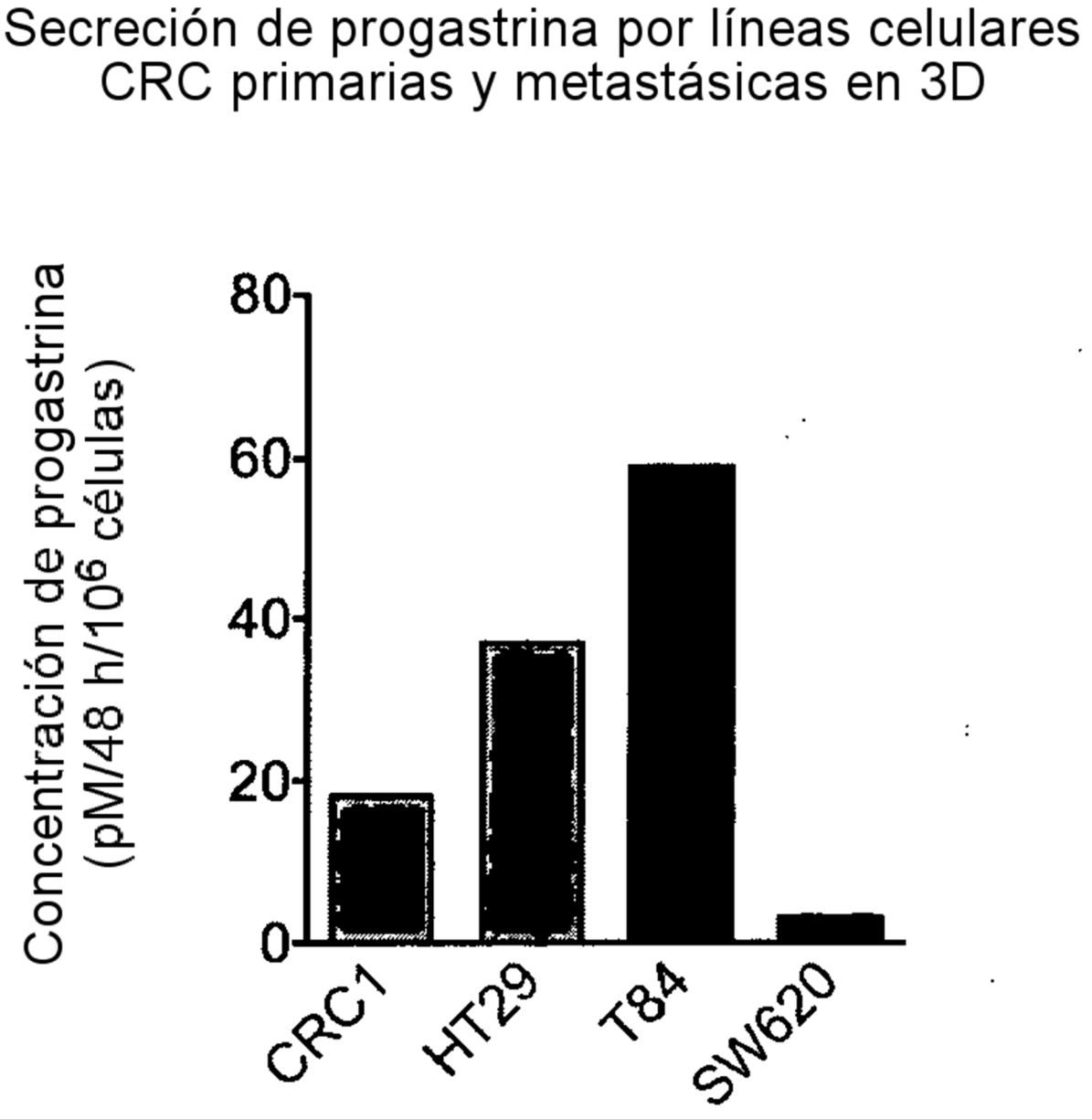
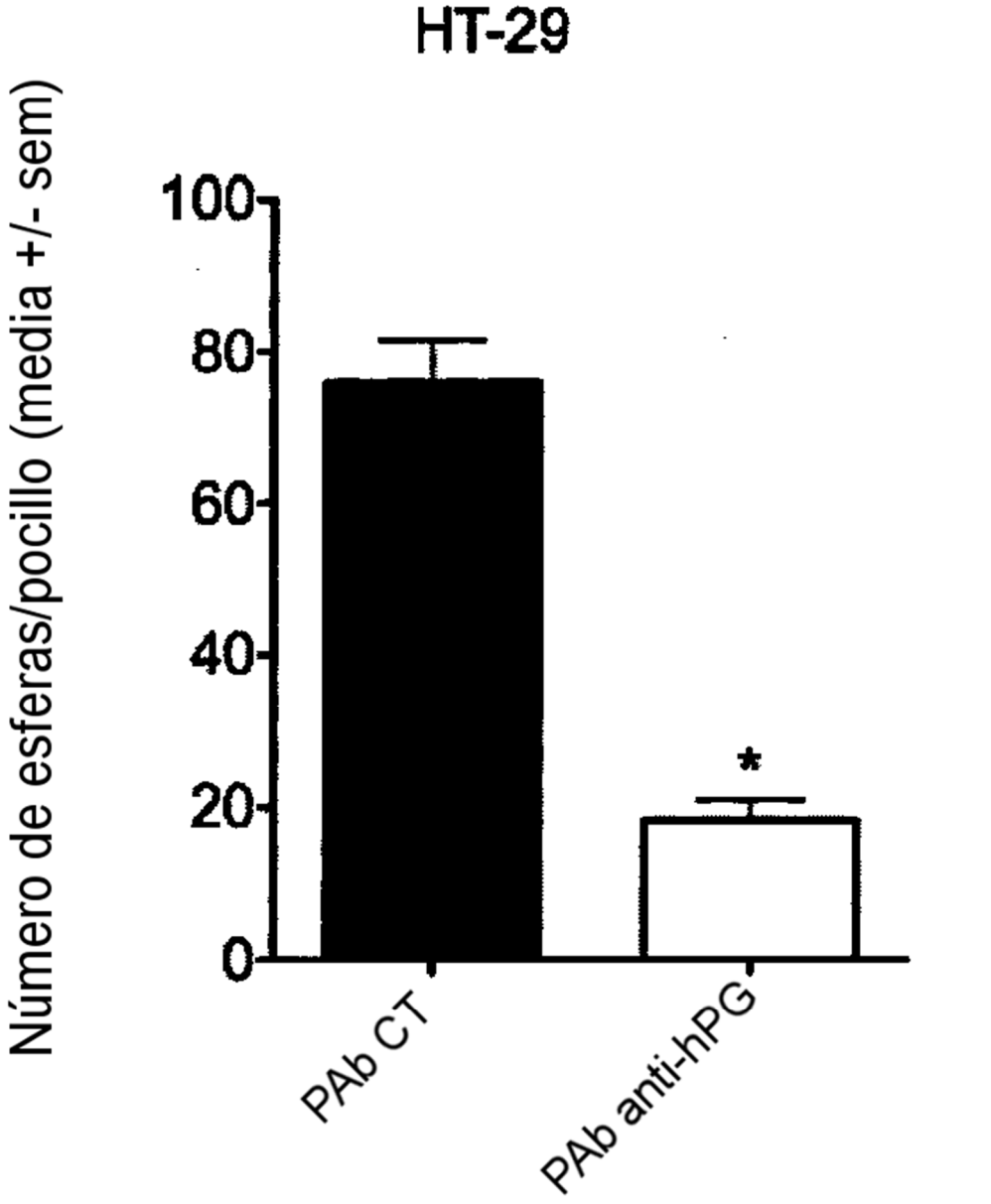
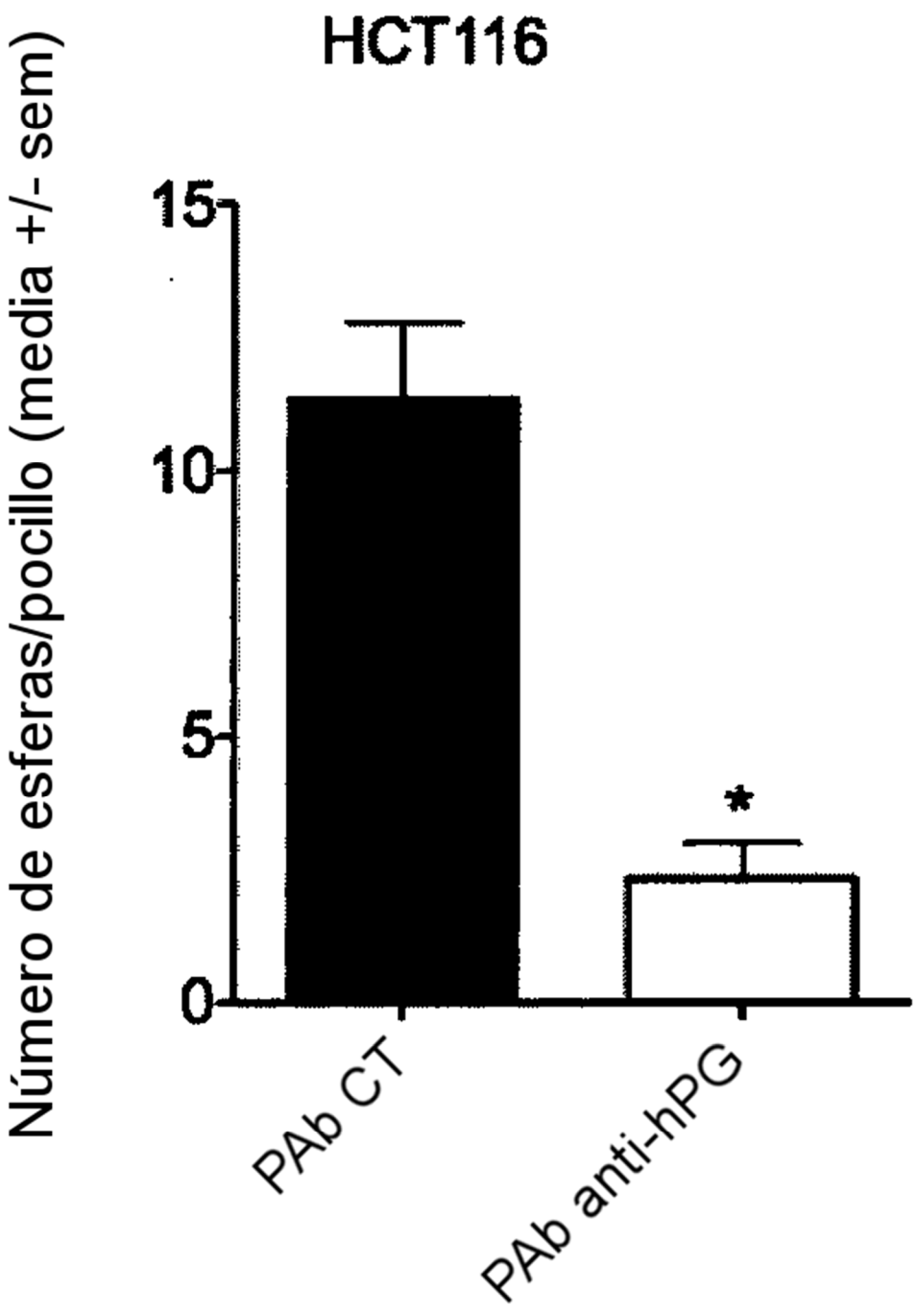

Secreción de progastrina por líneas celulares CRC primarias y metastásicas en 3D
Concentración de progastrina (pM/48 h/10⁶ células)
80
60
40
20
0
CRC1
HT29
T84
SW620

FIG. 15



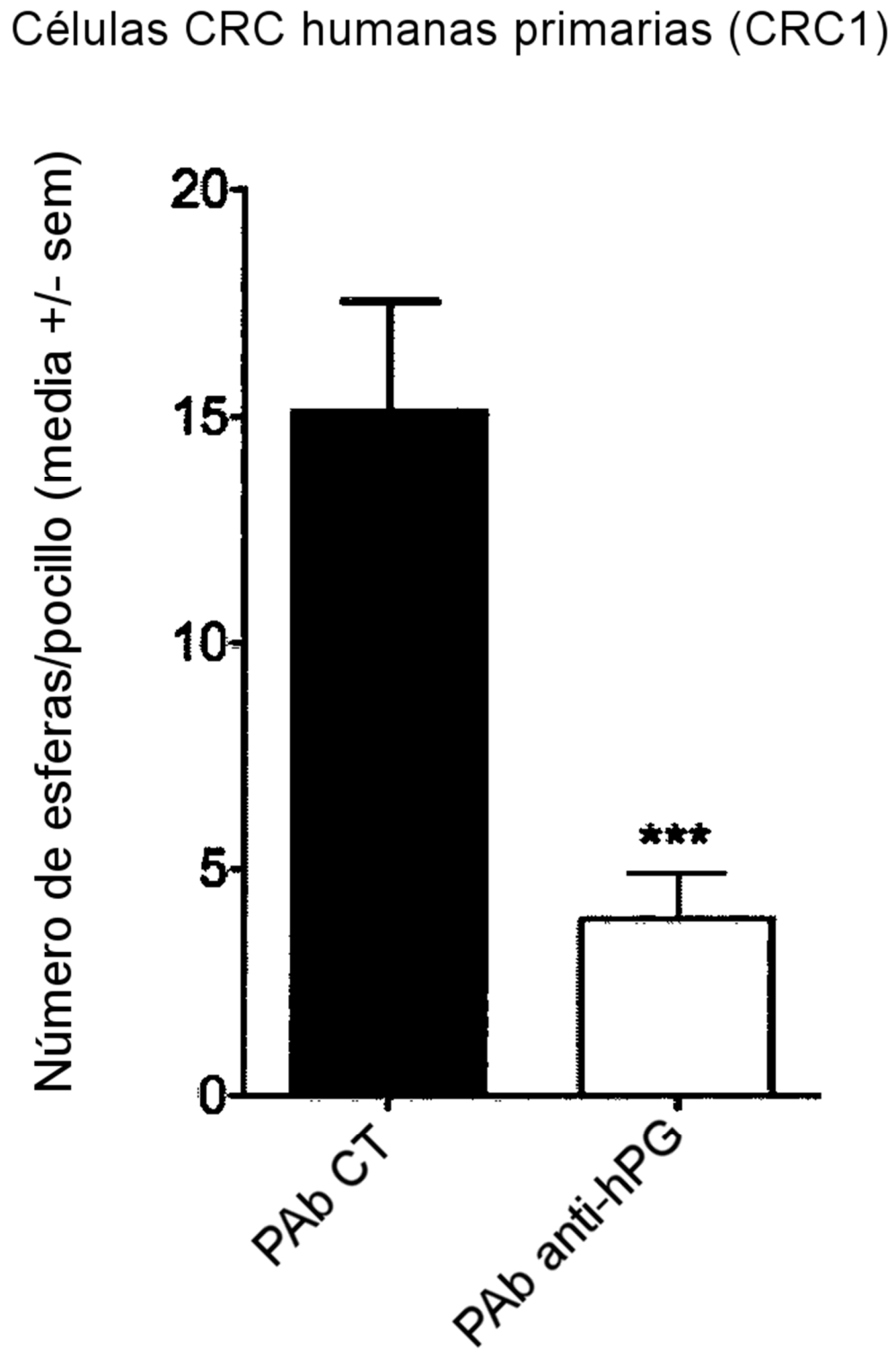
*p=0,0500 frente a PAb CT, Mann-Whitney

FIG. 16



*p=0,0383 frente a PAb CT, Mann-Whitney

FIG. 17



***p=0,0008 frente a PAb CT, Mann-Whitney

FIG. 18A y FIG. 19A

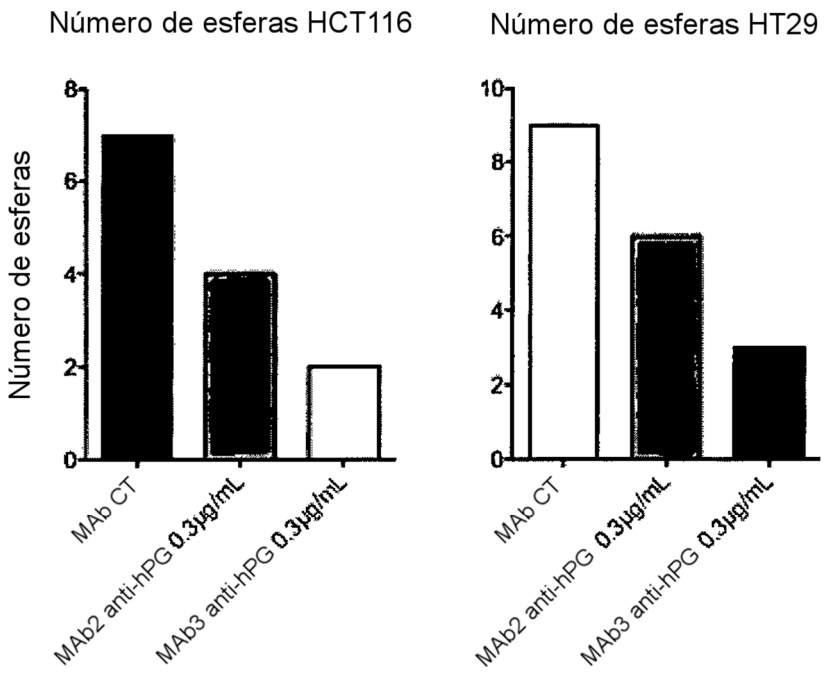


FIG. 18B y FIG. 19B

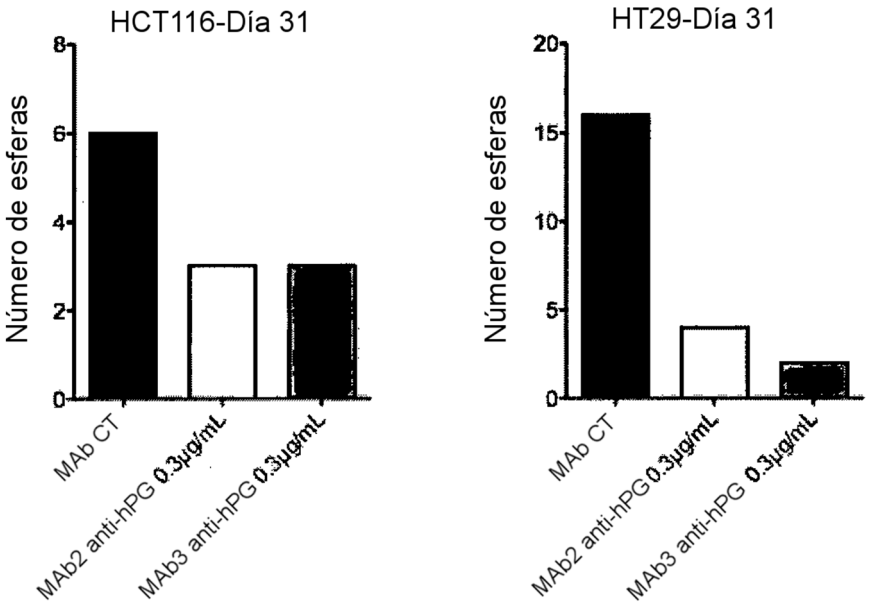


FIG. 20

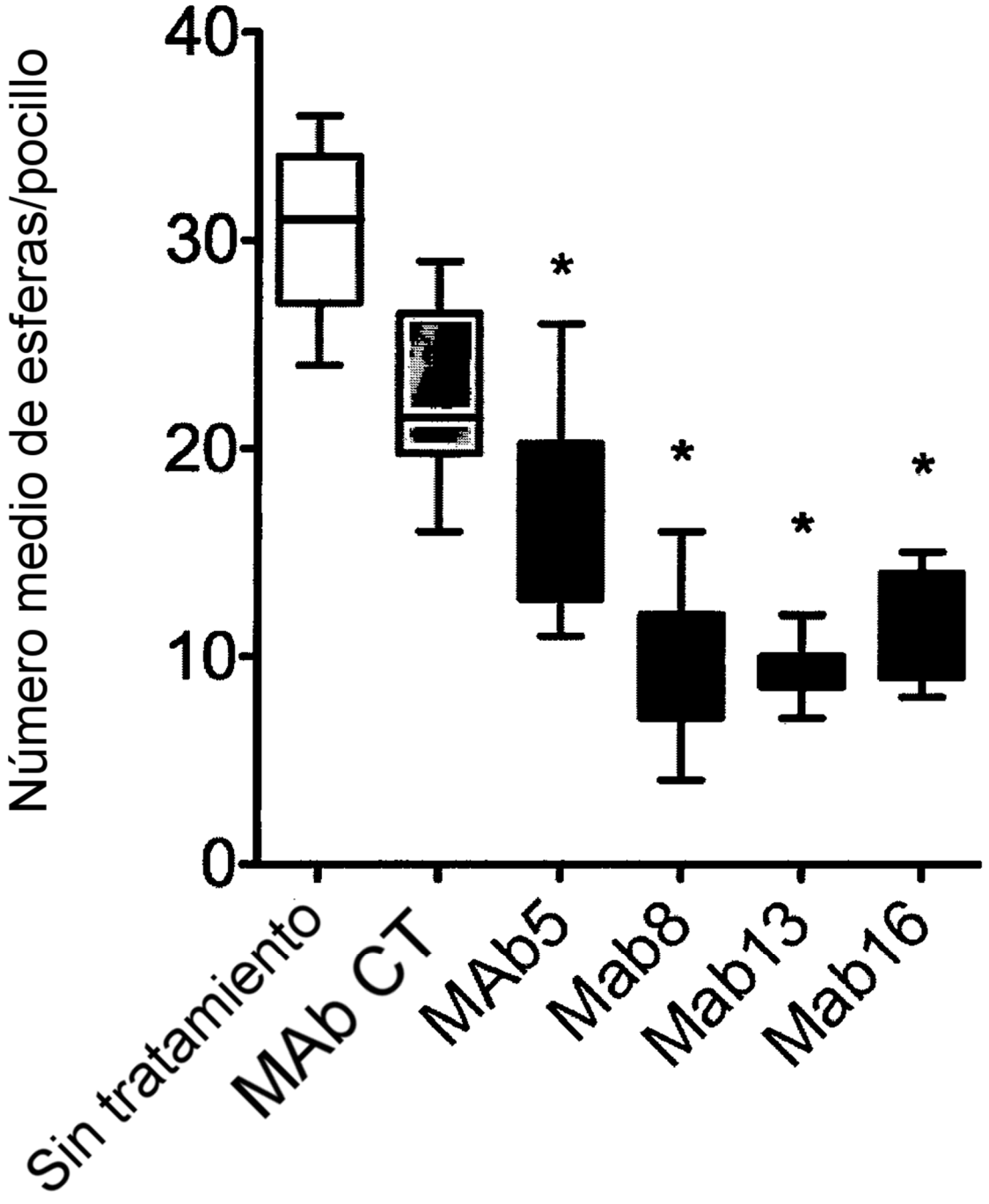

Número medio de esferas/pocillo
40
30
20
10
0
*
*
*
*
Sin tratamiento
MAb CT
MAb5
Mab8
Mab13
Mab16

FIG. 21

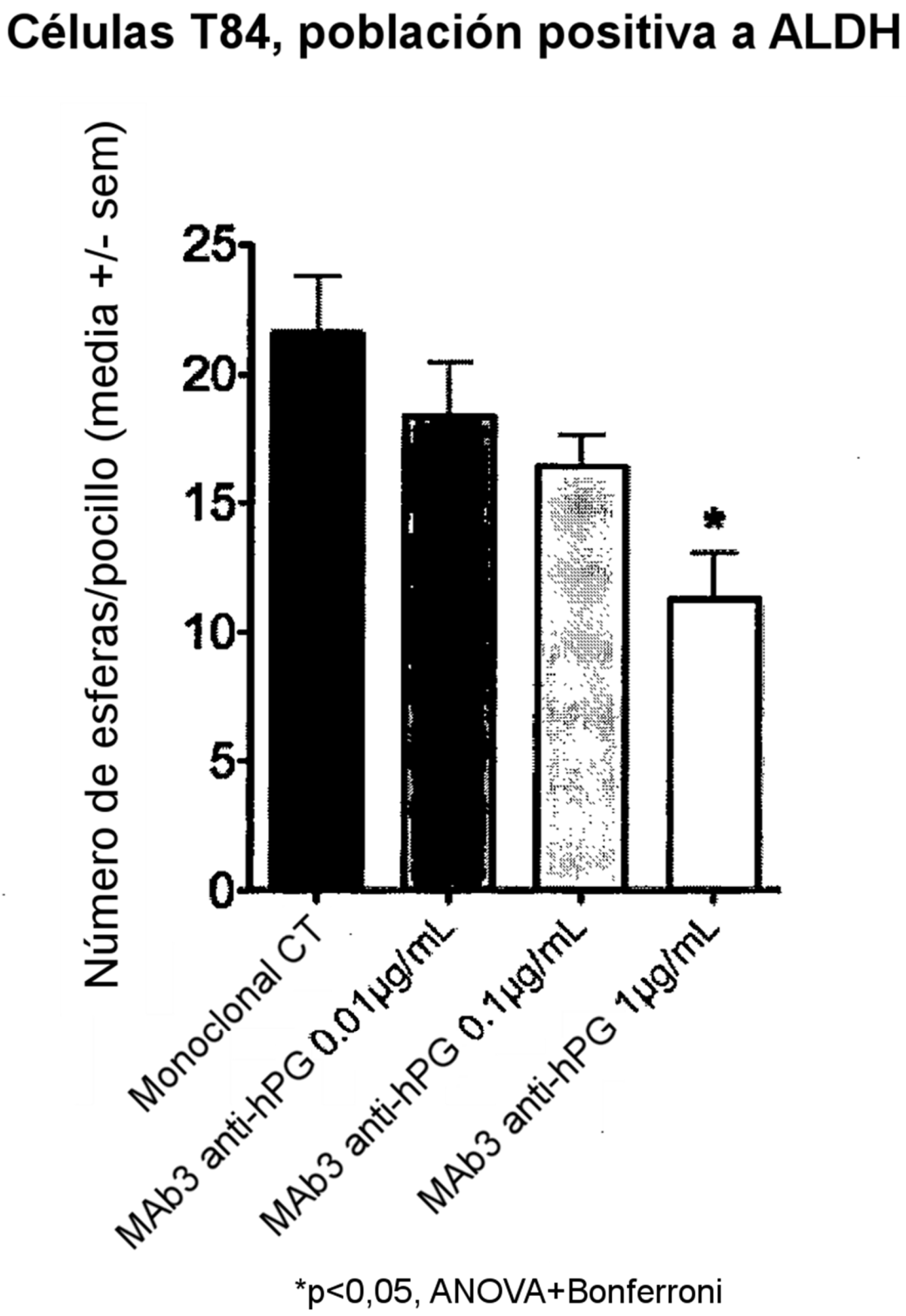

Células T84, población positiva a ALDH
Número de esferas/pocillo (media +/- sem)
25
20
15
10
5
0
*
Monoclonal CT
MAb3 anti-hPG 0.01µg/mL
MAb3 anti-hPG 0.1µg/mL
MAb3 anti-hPG 1µg/mL
*p<0,05, ANOVA+Bonferroni

FIG. 22

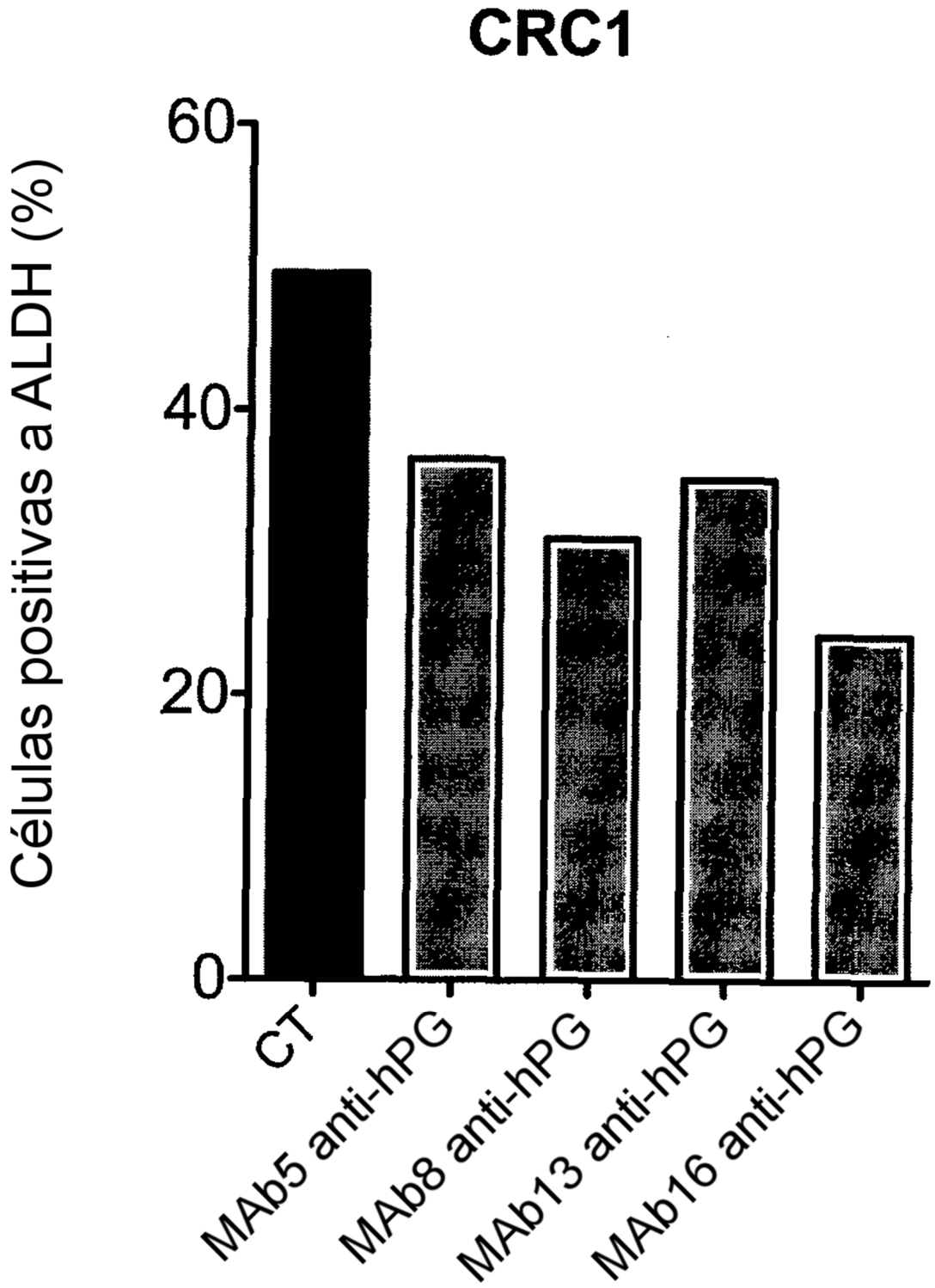
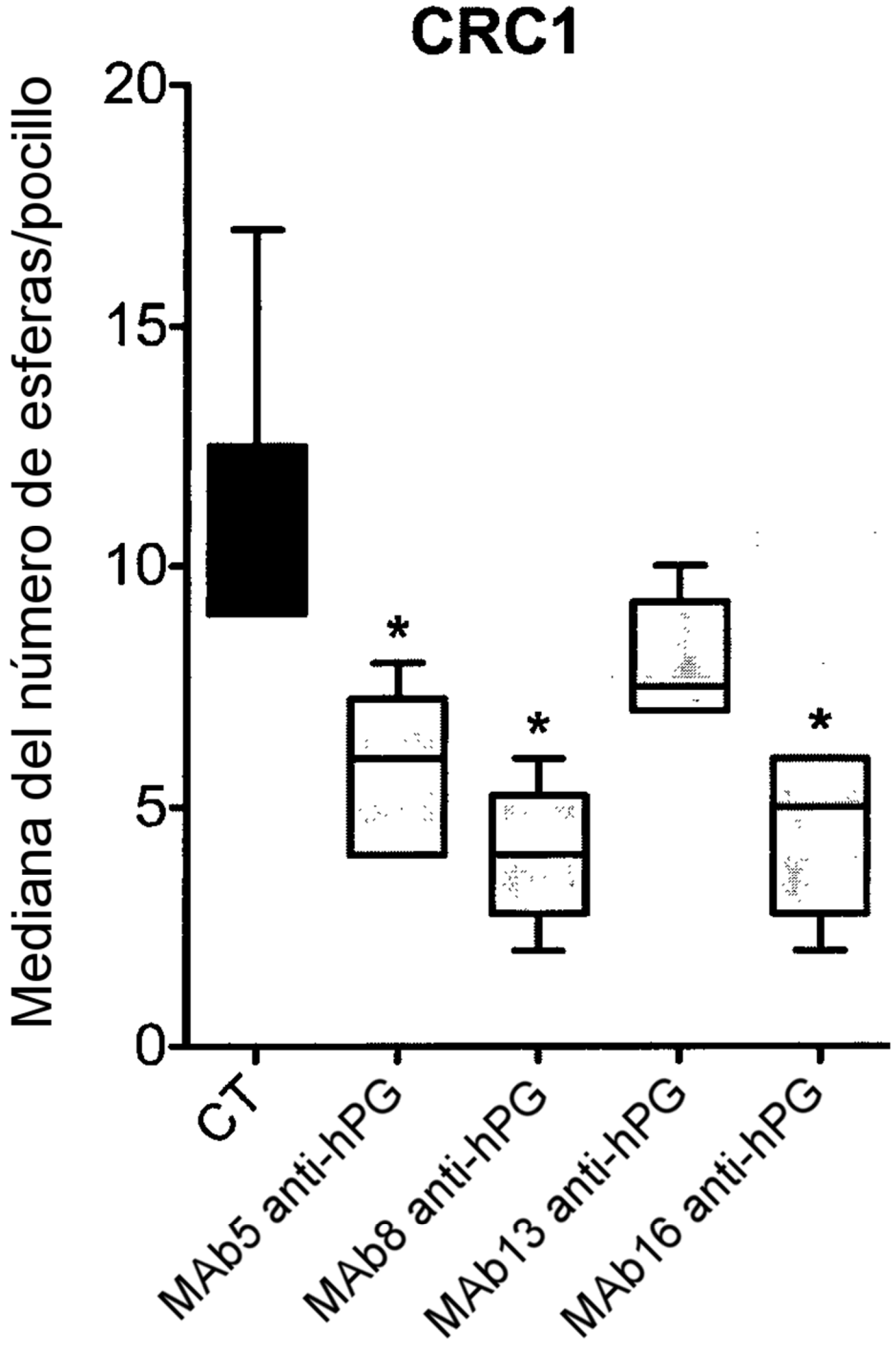

CRC1
Células positivas a ALDH (%)
60
40
20
0
CT
MAb5 anti-hPG
MAb8 anti-hPG
MAb13 anti-hPG
MAb16 anti-hPG

FIG. 23



*p<0,05 frente a CT,
ANOVA con ensayo post hoc de Bonferonni

FIG. 24

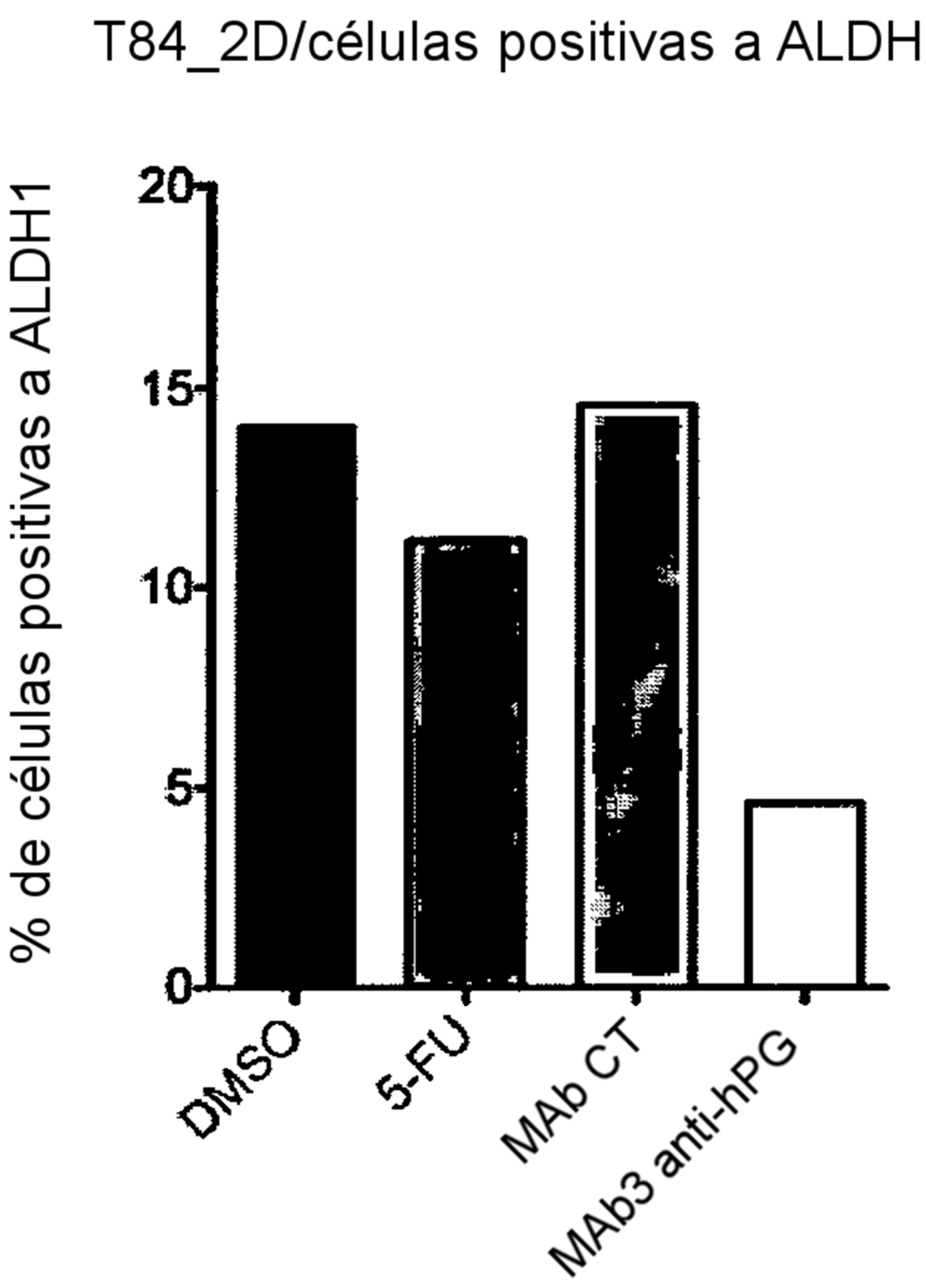

T84_2D/células positivas a ALDH
% de células positivas a ALDH1
20
15
10
5
0
DMSO
5-FU
MAb CT
MAb3 anti-hPG

FIG.25

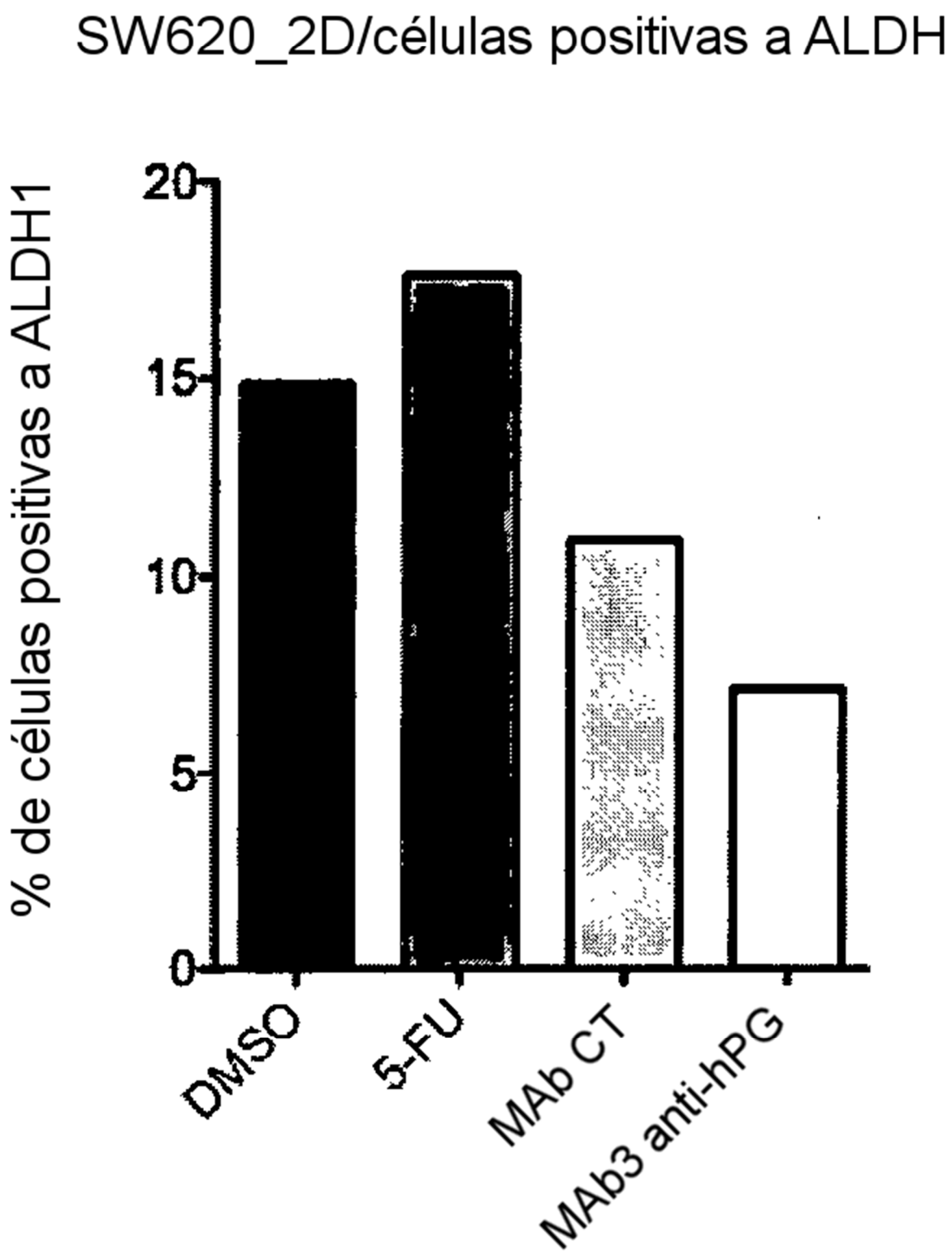
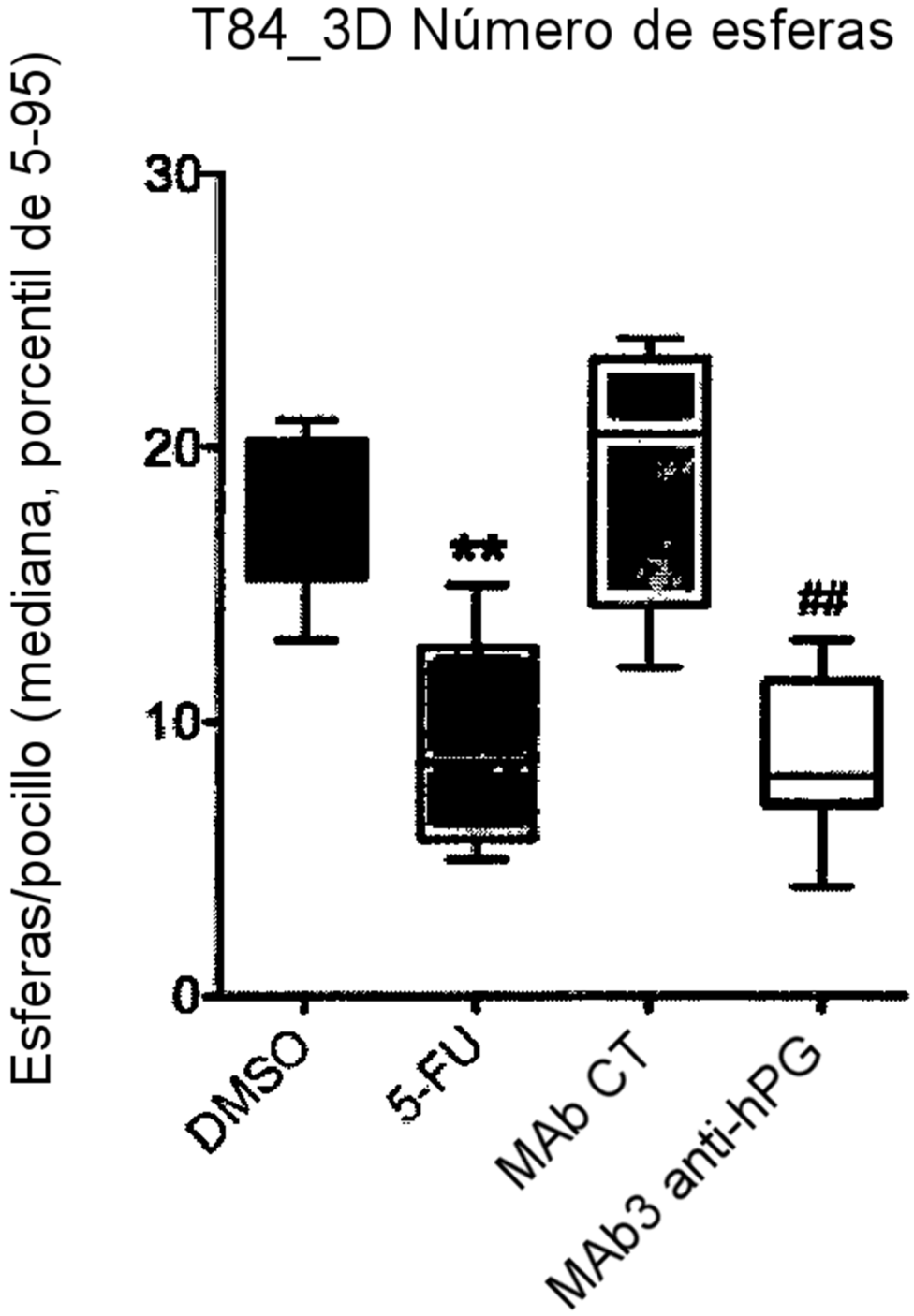
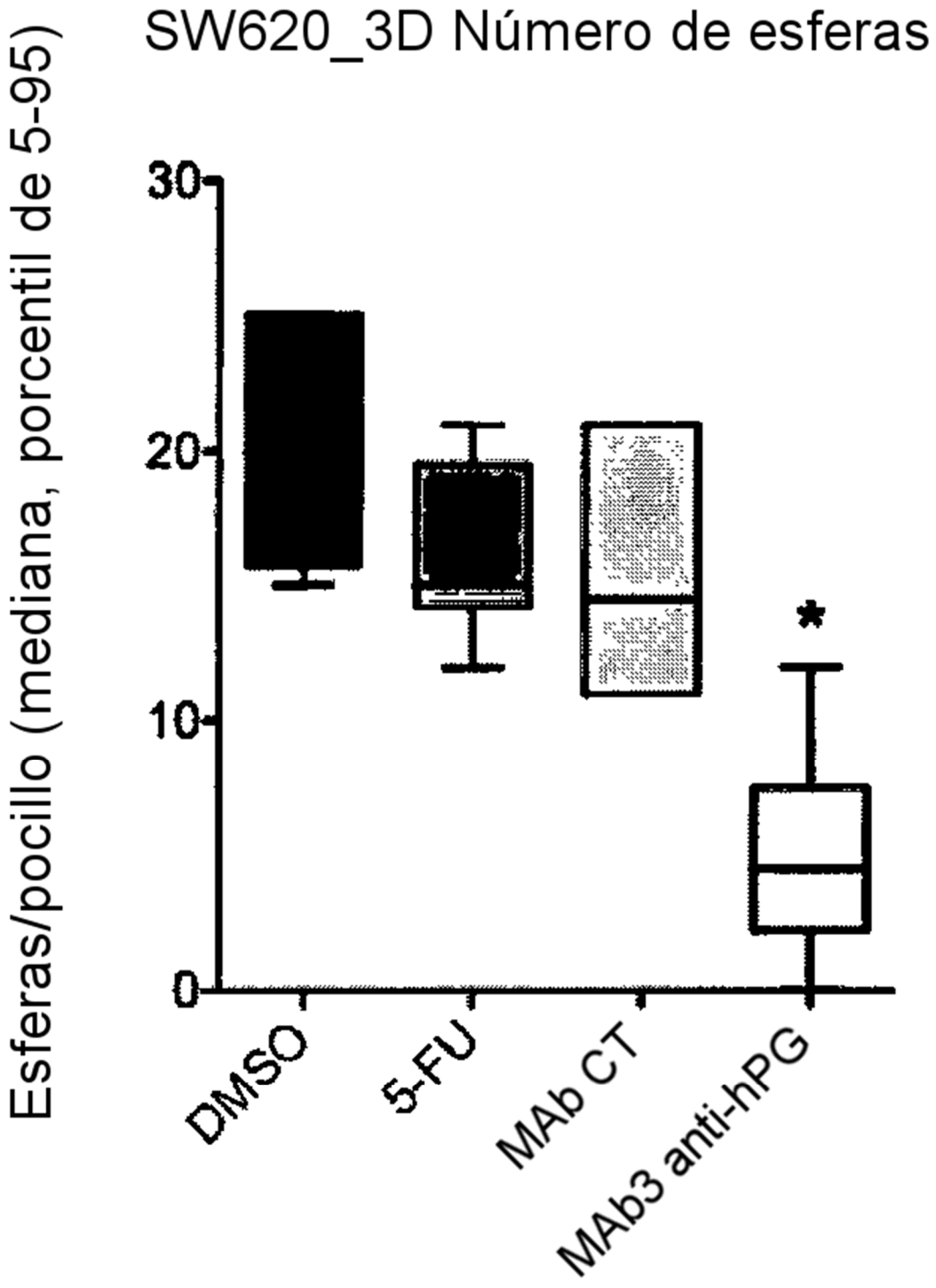

SW620_2D/células positivas a ALDH
% de células positivas a ALDH1
20
15
10
5
0
DMSO
5-FU
MAb CT
MAb3 anti-hPG

FIG. 26



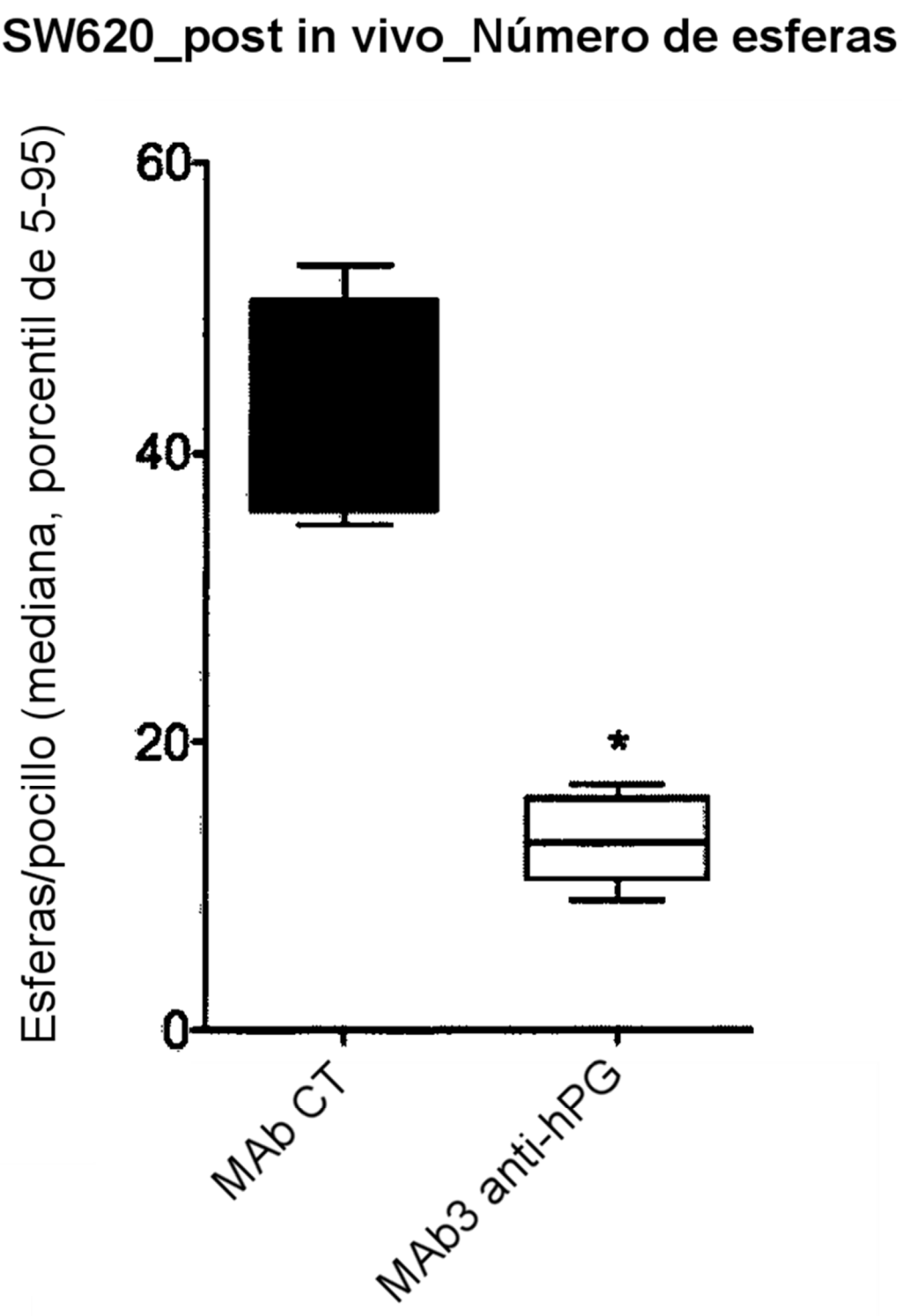
**p=0,0043 frente a DMSO y ##, p=0,0078 frente a MAb CT, ensayo de Mann-Whitney de dos colas

FIG. 27



*p=0,0159, ensayo de Mann-Whitney de dos colas

FIG. 28



*p=0,0119 frente a MAb CT, Mann-Whitney

FIG. 29

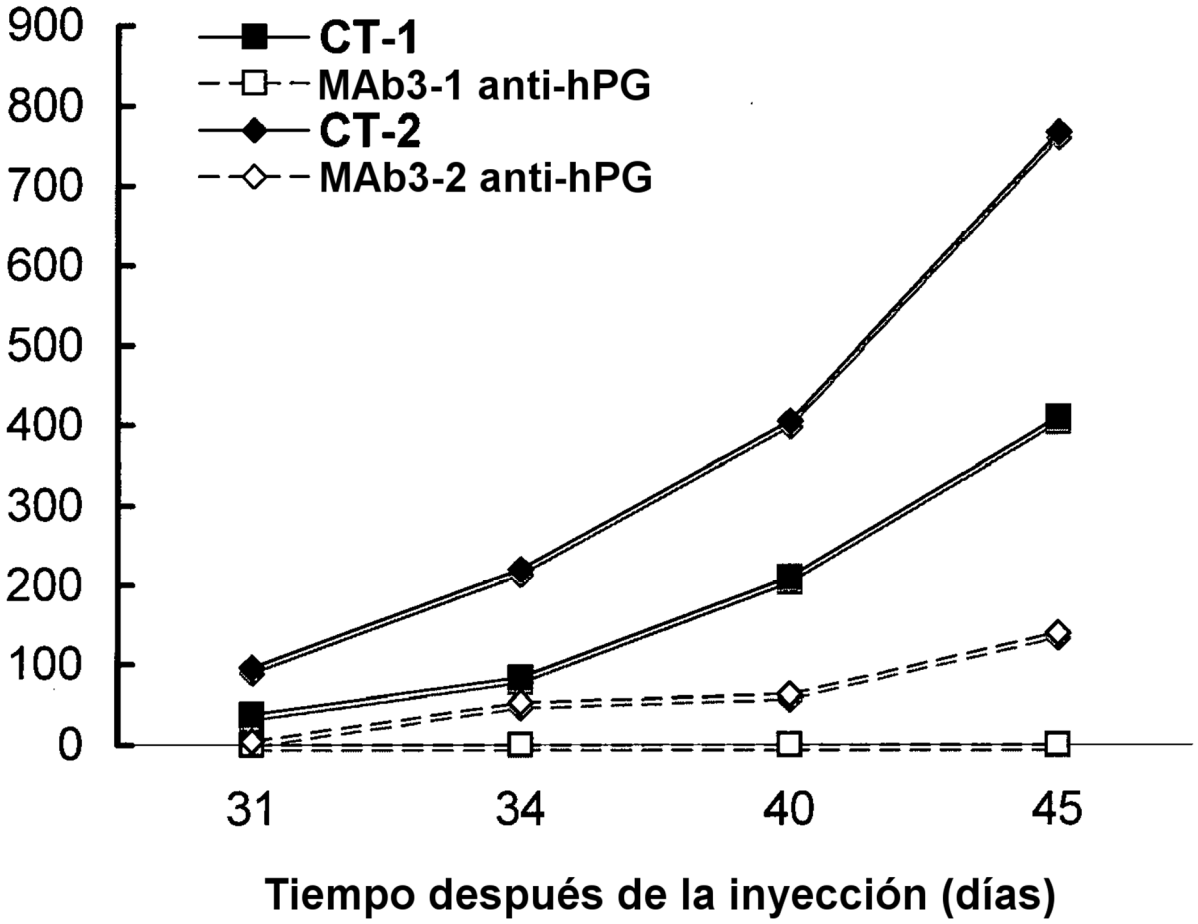

900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
CT-1
MAb3-1 anti-hPG
CT-2
MAb3-2 anti-hPG
31
34
40
45
Tiempo después de la inyección (días)

FIG. 30

Preprogastrina: M QRLCVYVLIF ALALAAFSEA SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
-21 -11 -1 +1 11 21

SEC ID nº:100

PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
31 41 51 61 71

Progastrina: SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
+1 11 21

SEC ID nº:101

PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
31 41 51 61 71

G34: QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD F-NH_2
SEC ID nº:102 41 51 61 71

G34-Gly: QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FG
SEC ID nº:103 41 51 61 71

G17: QGPWLE EEEEAYGWMD F-NH_2
SEC ID nº:104 61 71

G17-Gly: QGPWLE EEEEAYGWMD FG
SEC ID nº:105 61 71

CTFP: SAEDEN
SEC ID nº:106 75

ES 2 657 458 T3

FIG. 31A

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 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
```

FIG. 31B

mV_L MAb3

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

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

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

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

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
```

FIG. 31C

mV_H MAb4

```
cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc   48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc   96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr 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
```

FIG. 31D

mV_L MAb4

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 31E

mV_H MAb8

```
gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg   48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc act acc tat   96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser 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
```

FIG. 31F

mV_L MAb8

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 31G

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 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
```

FIG. 31H

mV_L MAb13

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

caa cca gcc tcc atc tcc tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt   96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser 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
```

FIG. 31I

mV_H MAb16

```
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
```

FIG. 31J

mV_L MAb16

```
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
```

FIG. 31K

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. 31L

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. 32A

hV_H MAb3

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

FIG. 32B

hV_L MAb3

```
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
```

FIG. 32C

hV_H MAb4

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

FIG. 32D

hV_L MAb4

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser **Gln Ser Leu Val His Ser**
20 25 30

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

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

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

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

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

FIG. 32E

hV_H MAb8(a)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 32F

hV_L MAb8(a)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 32G

hV_H MAb8(b)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 32H

hV_L MAb8(b)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 32I

hV_H MAb8(c)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 32J

hV_L MAb8(c)

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

FIG. 32K

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. 32L

hV_L MAb13(a)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 32M

hV_H MAb13(b)

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

FIG. 32N

hV_L MAb13(b)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 32O

hV_H MAb16(a)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 32P

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. 32Q

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. 32R

hV_L MAb16(b)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 32S

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. 32T

hV_L MAb16(c)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 32U

hV_H MAb19(a)

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser **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

FIG. 32V

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. 32W

hV_H MAb19(b)

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

FIG. 32X

hV_L MAb19(b)

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
115

FIG. 32Y

hV_H MAb19(c)

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser **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

FIG. 32Z

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