

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 690 943**

⑮ Int. Cl.:
C07K 16/26
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2010 PCT/EP2010/006329**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11045080**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10768878 (0)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2488551**

④ Título: **Anticuerpos monoclonales contra la progastrina y sus utilizaciones**

⑩ Prioridad:

16.10.2009 US 252625 P

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2018

⑦ 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 (C.N.R.S.) (33.3%)**

⑧ Inventor/es:

**PANNEQUIN, JULIE;
BOUDIER, LAURE;
JOUBERT, DOMINIQUE y
HOLLANDE, FRÉDÉRIC**

⑨ Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 690 943 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra la progastrina y sus utilizaciones.

5 **1. Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a anticuerpos monoclonales contra la progastrina, a composiciones y métodos para preparar dichos anticuerpos y a métodos para utilizar dichos anticuerpos, por ejemplo en el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer colorrectal.

10 **2. Antecedentes**

El cáncer colorrectal (CRC) es un problema de salud pública importante, que afecta a más de 1000000 de personas cada año y que es responsable de más de 500000 muertes cada año. El CRC es la segunda causa principal de muerte debida al cáncer. En los Estados Unidos sólo, para 2009, se indicaron aproximadamente 147000 nuevos casos y más de 49900 muertes debidas a CRC. Existen tres formas de CRC: CRC esporádico; cáncer de colon hereditario no poliposo (HNPCC), causado por mutaciones en la estirpe germinal en genes de reparación de emparejamientos erróneos de ADN y poliposis adenomatosa familiar (FAP), debida a mutaciones en la estirpe germinal en el gen APC. El CRC esporádico representa aproximadamente 85% de los casos, mientras que HNPCC representa aproximadamente 5% y FAP representa aproximadamente 1% (Heyer *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 5325-5333).

La gestión clínica de CRC implica típicamente la resección quirúrgica de tumores acompañada frecuentemente de quimioterapia. Actualmente, aproximadamente 50% de los pacientes con CRC mueren en los cinco años después del diagnóstico. La ausencia de ensayos de cribado fiables y la ineficacia de las terapias disponibles actualmente son las causas principales de la alta proporción de mortalidad. Existe una necesidad urgente de nuevas estrategias clínicas para diagnosticar el CRC, así como de tratamientos eficaces frente a los tumores de cáncer colorrectal que tengan efectos adversos mínimos en, por otra parte, el tejido sano.

30 **3. Sumario**

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal antiprogastrina como se define en las reivindicaciones.

35 La presente solicitud proporciona composiciones y métodos útiles para diagnosticar y/o tratar el cáncer colorrectal (CRC) en animales, incluyendo seres humanos. Las diferentes invenciones descritas en la solicitud se basan, en parte, en el descubrimiento de los solicitantes de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la progastrina (PG), por ejemplo, progastrina humana (hPG), un polipéptido producido por las células de tumor de CRC y que presenta propiedades antiproliferativas en modelos de CRC *in vitro*.

40 La progastrina es producida por las células de tumor colorrectal y se cree que estimula la proliferación de estas células desencadenando una ruta de transducción de la señal que bloquea los procesos de diferenciación normales de las células, incluyendo los procesos que dan lugar a la muerte celular. La disminución del transcripto del gen de la gastrina que codifica la progastrina induce la diferenciación celular y la muerte celular programada en células tumorales en modelos de CRC *in vitro* e *in vivo*, reduciendo la proliferación de las células tumorales. 45 Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de operación, a través de la unión de PG, se cree que los anticuerpos anti-hPG bloquean o inhiben su capacidad de interaccionar con su o sus pares de señalización. Esto, a su vez, inhibe una ruta de transducción de la señal en células de tumor colorrectal que de otra manera daría lugar a la proliferación.

50 De acuerdo con esto, en un aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PG, por ejemplo hPG, pero no a otros productos del gen de la gastrina. Respecto a la figura 1, el gen de la gastrina se traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos, denominado preprogastrina, que contiene una secuencia señal (subrayada) que se escinde, dando lugar a la progastrina, un polipéptido de 80 aminoácidos. La progastrina, a su vez, se escinde para generar un producto de 34 aminoácidos, correspondiente a los residuos 38 a 71 de la progastrina, que se extiende en su extremo carboxi con un residuo de glicina, generando G34 extendido con glicina ("G34-Gly"). Un subproducto de esta escisión es un péptido de 5 aminoácidos, denominado el péptido flanqueante C-terminal, o CFTP, que incluye los residuos 75 a 80 de la progastrina. Se escinde G34-Gly adicionalmente para generar un polipéptido de 17 residuos correspondiente en secuencia a los residuos 55 a 71 de la progastrina y al que se hace referencia como G17-Gly. La eliminación de las glicinas C-terminales de G34-Gly y G17-Gly, seguida de la amidación C-terminal, da lugar a G34 y G17, respectivamente, estando los dos amidados en el extremo C-terminal. Así, mientras los primeros 37 residuos de la progastrina son únicos a la misma (es decir, no están presentes en sus productos de procesamiento, tales como G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, o CFTP), los residuos 38 a 80 también están presentes en los productos posteriores a la traducción del gen de la gastrina.

En el contexto de la presente invención se ha descubierto que, aunque pueden generarse anticuerpos

monoclonales anti-PG usando métodos conocidos para los expertos en la materia, la selección del antígeno es importante. No todos los antígenos derivados de hPG estimulan la producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG bajo condiciones fisiológicas. Como se describe a continuación, varios antígenos usados para generar anticuerpos policlonales frente a hPG, tales como progastrina humana recombinante de

5 longitud completa (ver, por ejemplo, Singh WO 08/076454) y péptidos correspondientes a los últimos diez aminoácidos en el extremo C-terminal de hPG (ver, por ejemplo, Hollande WO 07/135542), fracasaron en la generación de anticuerpos monoclonales anti-hPG. Los anticuerpos monoclonales contra la progastrina se han obtenido supuestamente utilizando péptidos en el extremo N o C de la proteína (documento WO 2006/032980), pero estos anticuerpos no se unen de hecho a la progastrina. En el contexto de la presente invención, sin 10 embargo, se han descubierto secuencias N- y C-terminales antigenicas en la secuencia de hPG que pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG. Bastante sorprendentemente, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que no es necesario limitar las secuencias del antígeno a cadenas de la secuencia de PG que son únicas a la misma para obtener anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PG y no a otros productos derivados del gen de la gastrina. Los 15 antígenos peptídicos que presentan secuencias en común con otros productos del gen de la gastrina, por ejemplo G17, G34, y CTFP, proporcionaron anticuerpos monoclonales que no sólo se unen a hPG, sino que se unen a ella específicamente.

20 En el contexto de la presente invención se han generado anticuerpos monoclonales usando antígenos derivados de diferentes regiones de la molécula de hPG. Los anticuerpos monoclonales anti-PG que se pueden obtener usando un antígeno peptídico que presenta una secuencia correspondiente a una región N-terminal de hPG, y/o que se unen a una región N-terminal de hPG, se refieren en la presente memoria como "anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales." Una región antigenica ejemplificativa específica que puede usarse para concebir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales corresponde a los 25 residuos 1 a 14 de hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID nº: 25). Los inmunógenos ejemplificativos que incluyen este antígeno útiles para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales se describen en la tabla 1A y en la sección de los Ejemplos.

30 Se hace referencia en la presente memoria a los anticuerpos monoclonales anti-PG que se pueden obtener usando un antígeno peptídico que presenta una secuencia correspondiente a una región C-terminal de hPG, y/o que se unen a una región C-terminal de hPG, como "anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales." Una región antigenica ejemplificativa específica que puede usarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG C-terminales corresponde a los residuos 55 a 80 de hPG: QGPWLEEEAYGWMDFG RRSAEDEN (SEC ID nº: 27). Los inmunógenos ejemplificativas que incluyen este 35 antígeno útiles para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG C-terminales se describen en la tabla 1B y en la sección de los Ejemplos.

40 Para algunas utilizaciones, es deseable presentar anticuerpos monoclonales anti-hPG con alta afinidad para hPG. Para determinadas utilizaciones, tales como utilizaciones terapéuticas, es deseable una afinidad de por lo menos aproximadamente 100 nM, aunque los anticuerpos que presentan unas afinidades mayores, por ejemplo afinidades de por lo menos aproximadamente 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 incluso mayores, pueden ser deseables. Los distintos anticuerpos monoclonales anti-PG ejemplificativos específicos descritos en la presente memoria presentan afinidades comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-12} M (ver la tabla 6). Un anticuerpo monoclonal anti-PG que presenta una afinidad especialmente adecuada para una aplicación particular deseada puede 45 seleccionarse fácilmente de entre los mismos, o generarse o diseñarse usando los diferentes inmunógenos, secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR), secuencias variables de la cadena pesada V_H y variables de la cadena ligera V_L y métodos descritos en la presente memoria. La afinidad de cualquier anticuerpo monoclonal anti-PG particular puede determinarse usando técnicas muy conocidas en la 50 técnica o descritas en la presente memoria, tales como por ejemplo, ELISA, calorimetría isotérmica de titulación (ITC), BIACore, o ensayo de polarización fluorescente.

55 El hPG es un polipéptido relativamente pequeño, que presenta una longitud de únicamente 80 aminoácidos. Se esperaría que cualquier anticuerpo monoclonal que se una específicamente a hPG con una afinidad relativamente alta (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 10 nM) interfiera en la capacidad de PG de interaccionar con su o sus pares de señalización y, como resultado, inhiba la proliferación de las células de CRC. Sin embargo, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que no todos los anticuerpos monoclonales anti-PG son neutralizantes (es decir, no todos los anticuerpos monoclonales que se unen a PG interfieren en o inhiben su actividad de señalización biológica). De hecho, como se expone con mayor detalle en 60 la sección de los Ejemplos, en el contexto de la presente invención se ha descubierto que algunos de los anticuerpos monoclonales anti-PG, a pesar de presentar una especificidad alta y una afinidad alta para PG, no neutralizan PG. Por ejemplo, el MAbs14 anti-hPG se une a hPG con una K_D de aproximadamente 6 pM pero no inhibe el crecimiento de las células de CRC *in vitro* como se detalla en la sección de los Ejemplos a continuación. Aunque los anticuerpos monoclonales no neutralizantes que se unen específicamente a hPG son útiles para 65 propósitos de diagnóstico, los anticuerpos monoclonales anti-hPG que neutralizan PG son particularmente adecuados para las aplicaciones terapéuticas para tratar CRC.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante" es un anticuerpo monoclonal anti-hPG que da lugar a una reducción estadísticamente significativa del número de células de CRC vivas en una muestra de ensayo tratada con el anticuerpo monoclonal anti-hPG comparado con una muestra control tratada con un anticuerpo monoclonal no específico. Un ensayo específico para evaluar la capacidad de

5 cualquier anticuerpo monoclonal anti-hPG particular para neutralizar hPG se describe en la sección de la Descripción Detallada a continuación. Se cree que los anticuerpos monoclonales anti-hPG que presentan por lo menos aproximadamente 50% de reducción del número de células vivas en este ensayo son especialmente útiles para tratar CRC, aunque se espera que los anticuerpos monoclonales anti-hPG que presentan niveles menores de actividad neutralizante, por ejemplo, una reducción estadísticamente significativa de 40%, 30%, 10

20, 20%, 15%, o incluso 10% del número de células vivas en este ensayo proporcionen beneficios terapéuticos.

De acuerdo con esto, en algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-PG son anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes. Se ha descubierto que la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG para neutralizar PG no es dependiente de epítopo. Como se exemplifica en la sección de los Ejemplos, tanto los

15 anticuerpos anti-PG N-terminales como C-terminales tienen actividad neutralizante. Así, en algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes son anticuerpos neutralizantes N-terminales, en otras formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-PG son anticuerpos neutralizantes C-terminales.

20 El mapeo de epítopos revela que los anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales no se unen todos al mismo epítopo, incluso cuando se generan frente al mismo inmunógeno. Lo mismo es cierto para los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales. Los epítopos unidos por los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales y C-terminales ejemplificativos, según se identifica mediante escaneo de alanina y técnica SPOT, se proporcionan en la sección de los Ejemplos, en las tablas 8 y 9.

25 25 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen a un epítopo que incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte N-terminal de hPG. En formas de realización específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales se unen a un epítopo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID nº: 28), residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID nº: 29), residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID nº: 30), residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID nº: 31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID nº: 32).

30 30 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen a un epítopo que incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte de una región C-terminal de hPG. En las formas de realización específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales se unen a un epítopo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID nº: 33), residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID nº: 34), residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID nº: 35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID nº: 36).

35 40 45 Se espera que las CDR y/o cadenas V_H y V_L correspondientes de los anticuerpos monoclonales anti-hPG que se unen aproximadamente a los mismos epítopos puedan intercambiarse para dar lugar a nuevos anticuerpos monoclonales anti-hPG. Por ejemplo, como se indica en la Tabla 9, los anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos MAb 5 y MAb 6 se unen al mismo epítopo. Puede diseñarse un anticuerpo monoclonal anti-hPG que incluya, en su cadena V_L , varias combinaciones de las CDR de V_L de estos dos anticuerpos, y/o en su cadena V_H varias combinaciones de las CDR de V_H de estos dos anticuerpos. Como un ejemplo específico, para ilustrar las varias combinaciones posibles, dicho anticuerpo podría incluir en su cadena V_L , las CDR 1 y 2 de MAb 5 (V_L CDR1.5 y V_L CDR2.5, respectivamente) y CDR 3 de MAb 6 (V_L CDR3.6), y en su cadena V_H , la CDR 1 de MAb 6 (V_H CDR1.6) y las CDR 2 y 3 de MAb 5 (V_H CDR2.5 y V_H CDR3.5, respectivamente).

50 55 Se han identificado varios anticuerpos monoclonales anti-hPG que tienen una alta especificidad y afinidad para hPG y que presentan una buena actividad antitumoral en ensayos *in vitro*, y en algunos casos se han determinado las secuencias de sus CDR, secuencias de sus cadenas V_H y V_L , y/o secuencias de cadenas V_H y V_L propuestas para las versiones humanizadas. También se han depositado varios hibridomas. Todos estos anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos, así como otras formas de realización específicas de anticuerpos monoclonales anti-hPG útiles en los diferentes kits y métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo anticuerpos monoclonales que compiten para la unión a PG con un anticuerpo de referencia, se describen con mayor detalle en la sección de la Descripción Detallada.

60 65 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción incluyen anticuerpos que compiten con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia para la unión a hPG. El anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia puede ser cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria. Los ejemplos no limitativos incluyen: anticuerpos que comprenden tres CDR de V_L y tres CDR de V_H como se describe en la presente memoria; anticuerpos que comprenden una cadena V_H y una cadena V_L que presentan secuencias de aminoácidos como se muestra en la presente memoria; anticuerpos que comprenden polipéptidos de cadena pesada y ligera humanizados como se muestra en la presente memoria; anticuerpos producidos por uno cualquiera de los hibridomas descritos en la presente memoria; anticuerpos que se unen a un epítopo en hPG como se describe en la presente memoria.

65 Los anticuerpos monoclonales anti-PG descritos en la presente memoria pueden estar en forma de anticuerpos de longitud completa, anticuerpos de múltiples cadenas o de cadena única, fragmentos de dichos anticuerpos

que se unen selectivamente a PG (incluyendo pero no limitado a Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, y scFv), surrobodies (incluyendo construcción de cadena ligera sucedánea), anticuerpos de un único dominio, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados y similares. También pueden ser de, o derivados de, cualquier isotipo incluyendo, por ejemplo, IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), o IgM. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-PG es una IgG (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

5 Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden tener un origen humano o no humano. Los ejemplos de anticuerpos anti-PG con un origen no humano incluyen, pero no están limitados a, los de origen de mamíferos (por ejemplo, simios, roedores, cabras y conejos). Los anticuerpos monoclonales anti-PG para uso terapéutico en 10 seres humanos están preferentemente humanizados.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos aptos para ser usados para producir anticuerpos monoclonales anti-PG. Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada de inmunoglobulinas para los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria, y los vectores que comprenden los ácidos nucleicos. Además, en la presente memoria se proporcionan células hospedadoras procariotas y eucariotas transformadas con dichos vectores, así como 20 células hospedadoras eucariotas, por ejemplo, de mamíferos, modificadas por ingeniería para expresar los polipéptidos de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales anti-hPG. También se proporcionan células hospedadoras aptas para expresar tanto la cadena ligera como pesada y secretar los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras. En 25 algunas formas de realización, la célula hospedadora es un hibridoma. También se proporcionan métodos para producir anticuerpos monoclonales anti-hPG cultivando las células hospedadoras.

30 Los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes, tales como anticuerpos monoclonales anti-hPG, se unen a PG y bloquean la señalización dependiente de PG, lo que da como resultado la inhibición de las respuestas inducidas por PG en las células de tumor de CRC. De acuerdo con esto, también se proporcionan métodos para inhibir las respuestas inducidas por PG de células de CRC, lo que incluye la represión de la diferenciación celular, represión de la muerte celular y/o estimulación de la proliferación celular. Generalmente, el método comprende poner en contacto una célula de CRC con, o exponer una población de células a, un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante en una cantidad eficaz para inhibir una o más de las respuestas inducidas por PG en células de CRC. El método puede realizarse *in vitro* o *in vivo*, por la administración de un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante al entorno que contiene células de CRC, que podría ser un cultivo celular o en 35 un tumor.

40 Los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes descritos en la presente memoria inhiben la proliferación dependiente de PG de las células de tumor de CRC, convirtiéndose así en agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer colorrectal. De acuerdo con esto, también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante y métodos para usar los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes y/o composiciones farmacéuticas para tratar CRC. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier ruta conveniente de administración, incluyendo por ejemplo inyección parenteral, subcutánea o intravenosa e incluirá típicamente un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes aceptables, adecuados para el modo deseado de administración y pueden incluir otros componentes opcionales como se describirá con mayor detalle en la sección de la Descripción Detallada. Para usos terapéuticos, las composiciones pueden envasarse en forma de 45 dosificación unitaria para facilitar su uso.

50 Los métodos de tratamiento comprenden generalmente administrar a un sujeto que necesita tratamiento, por ejemplo un sujeto diagnosticado de CRC, una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante y/o composición farmacéutica de éste eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. El beneficio terapéutico, descrito a continuación con mayor detalle, incluye cualquier mejora de CRC, por ejemplo, ralentizar o parar la progresión de CRC, reducir la gravedad de CRC, inhibir el crecimiento de tumores de CRC o la proliferación de células de CRC, reducir el tamaño de los tumores de CRC y/o reducir los niveles séricos de PG en pacientes con CRC. El sujeto puede ser un ser humano o no humano, incluyendo un animal doméstico (por ejemplo, gato, perro, vaca, cerdo, caballo) o un animal no doméstico. Preferentemente, el anticuerpo monoclonal anti-PG es 55 específico para la PG de la especie que se trata. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hPG se administra a un paciente humano, un anticuerpo anti-PG de perro se administra a un paciente canino, y similares. Los sujetos en los que la terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG es útil pueden: ser pacientes en cualquier estadio de la progresión de la enfermedad (por ejemplo, CRC Estadio 0, I, II, III, o IV), pacientes que han recibido terapia para CRC (por ejemplo, quimioterapia, terapia de radiación, resección quirúrgica) o pacientes que están recibiendo otra terapia para CRC.

60 El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-PG como se describe en la presente memoria puede combinarse con, o ser adyuvante de, otra terapia. Los ejemplos no limitativos de otra terapia para CRC incluyen tratamiento quimioterápico, terapia de radiación, resección quirúrgica y terapia de anticuerpos, como se describe en la presente memoria. En un ejemplo específico, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se administran en combinación con agentes quimioterápicos. En otro ejemplo específico, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se administran como adyuvante con resección quirúrgica. Los anticuerpos monoclonales anti-PG también pueden 65

usarse en combinación uno con otro.

Los individuos con tumores de CRC tienen frecuentemente niveles elevados de PG circulante (por ejemplo, en suero o plasma). De acuerdo con esto, los anticuerpos monoclonales anti-hPG pueden usarse para detectar

5 niveles de PG para el diagnóstico de CRC. Además, en los pacientes ya diagnosticados con CRC, los anticuerpos monoclonales anti-hPG pueden usarse para seleccionar sujetos adecuados para recibir terapia anti-PG, o para monitorizar la eficacia del tratamiento. Como se describe en la presente memoria, un método para diagnosticar cáncer colorrectal en un sujeto comprende determinar si la cantidad de progastrina en una muestra del sujeto, por ejemplo una muestra de sangre o una muestra de suero, medida usando un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la presente descripción, está por encima de un nivel umbral. En una forma de realización específica, el nivel umbral es 50 pM. En algunas formas de realización, se usan dos anticuerpos anti-PG, uno que reconoce una región C-terminal de PG y el otro que reconoce una región N-terminal de PG. En esta forma de realización, uno o los dos de los anticuerpos N-terminal o C-terminal es un anticuerpo monoclonal anti-PG como se describe en la presente memoria. Preferentemente, se usan anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales y C-terminales. Los anticuerpos pueden ser, pero no necesitan ser, neutralizantes.

10 Para monitorizar la eficacia del tratamiento, los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden usarse para determinar si el nivel de progastrina disminuye con el tiempo en muestras de un sujeto que se ha tratado o se está tratando para CRC comparando la cantidad de PG en muestras tomadas en momentos diferentes. Las 15 formas de realización específicas de anticuerpos anti-PG descritas en el párrafo anterior también pueden usarse en este ensayo.

20 También se proporcionan unos kits adecuados para realizar los diferentes métodos de diagnóstico, monitorización y otros descritos en la presente memoria. Dichos kits comprenderán típicamente un anticuerpo monoclonal anti-PG como se describe en la presente memoria y, opcionalmente anticuerpos anti-PG adicionales y/o reactivos adecuados para llevar a cabo el ensayo específico. En algunas formas de realización, uno o más 25 anticuerpos anti-PG incluidos en el kit están marcados con un marcaje detectable, tal como un fluoróforo. En una forma de realización específica, el kit incluye un anticuerpo anti-PG que se une específicamente a una región N-terminal de PG, un anticuerpo anti-PG que se une específicamente a una región C-terminal de PG y, 30 opcionalmente, reactivos adecuados para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico, en el que el anticuerpo N-terminal específico es un anticuerpo monoclonal anti-PG N-terminal como se describe en la presente memoria y/o el anticuerpo C-terminal específico es un anticuerpo monoclonal anti-PG C-terminal como se describe en la 35 presente memoria.

35 **4. Breve descripción de las figuras**

40 La figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de preprogastrina, progastrina y productos de tratamiento de la progastrina incluyendo G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, y el péptido flanqueante C-terminal, CTFP.

45 La figura 2 proporciona las secuencias de polipéptido, y el polinucleótido correspondiente, de las cadenas V_H y V_L para anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplificativos: anti-hPG MAbs 3 (SEC ID nº 16, 12, 17

50 y 13, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2A, 2B), anti-hPG MAAb 4 (SEC ID nº 18, 14, 19 y 15, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2C, 2D), anti-hPG MAAb 8 (SEC ID nº 67, 59, 71 y 63,

55 respectivamente, en orden de aparición) (figura 2E, 2F), anti-hPG Mab 13 (SEC ID nº 68, 60, 72 y 64, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2G, 2H), anti-hPG MAAb 16 (SEC ID nº 69, 61, 73 y 65, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2I, 2J), y anti-hPG MAAb 19 (SEC ID nº 70, 62, 74 y 66, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2K, 2L), en los que las tres CDR de cada cadena están 60 subrayadas.

55 Las figuras 3A-C proporcionan gráficos que ilustran las afinidades relativas de unión (medidas como absorbancia a 492 nm) a concentraciones crecientes de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) de anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplificativos, MAbs 1-4 (figura 3A); MAbs 5-14 y 20-23 (figura 3B); y MAbs 3 y 15-19 (figura 3C).

60 La figura 4 proporciona un gráfico que ilustra la proporción de absorbancia (densidad óptica) a 280 nm y 330 nm para cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplificativos diferentes comparados con una muestra control de albúmina de suero bovino (unidades arbitrarias).

65 Las figuras 5A-C proporcionan gráficos que ilustran la unión de 23 anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplificativos diferentes a 25 o 50 ng de hPG comparado con: amortiguador solo (control negativo), 250 ng de KLH (control negativo), y péptidos derivados del gen de la gastrina (50 y 250 ng de CTFP, G17, o G17-Gly (al que se hace referencia en la figura como "G-Gly")), como se indica. La figura 5A muestra la unión de anti-hPG MAbs 1-4, la figura 5B representa la unión de anti-hPG MAbs 5-14 y 21-23, y la figura 5C representa la unión de anti-hPG MAbs 3 y 15-20,

70 La figura 6 proporciona un gráfico que ilustra la unión de un anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal a hPG

a concentraciones crecientes de anti-hPG MAb3.

La figura 7 proporciona gráficos que ilustran la proliferación de estirpes celulares de CRC representativas tratadas con anticuerpos monoclonales anti-hPG como se expone a continuación: SW480, HCT-116, LS174T, como se indica, tratadas con anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos MAb 3 y MAb 4 (figuras 7A, 7B, 7C, respectivamente, mostrando el cambio en el número de células vivas al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0) con anticuerpo), o un anticuerpo policlonal anti-hPG (figuras 7D, 7E, 7F, respectivamente, mostrando el cambio en el número de células vivas al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0) con anticuerpo); proliferación de la estirpe celular de CRC SW620 tratada con anti-hPG MAb 5 a MAb 23 (figura 7G, mostrando células vivas tratadas con anti-hPG como porcentaje del número de células tratadas con anticuerpo control al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0)); proliferación de células LS174T tratadas con anti-hPG MAb 8, 13, 14, 16, y 19 (figura 7H, mostrando células vivas tratadas con anti-hPG como porcentaje del número de células tratadas con anticuerpo control al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0)); y proliferación de células HCT-116 tratadas con anticuerpos monoclonales anti-hPG MAb 8, 13, 14, 16, 19 (figura 7I, mostrando células vivas tratadas con anti-hPG como porcentaje del número de células tratadas con anticuerpo control al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0)).

La figura 8 proporciona un gráfico que ilustra el número de células LS174T vivas a las 48 horas después de 4 tratamientos con un anticuerpo monoclonal control, anti-hPG MAb 8 (5 µg/ml), anti- hPG MAb 8 preincubado con hPG, el anticuerpo control preincubado con hPG, o hPG solo.

La figura 9 proporciona gráficos que ilustran el número de tumores por ratón (figura 9A) y la longitud y altura medias del tumor (figura 9B) en ratones tratados con anticuerpos anti-hPG comparado con un anticuerpo policlonal control.

5. Descripción detallada de las formas de realización ejemplificativas

5.1 Descripción detallada

La progastrina (PG) se identificó por primera vez como el precursor de la gastrina, una hormona peptídica intestinal que estimula la secreción de ácido gástrico. La gastrina existe en varias formas moleculares diferentes (G17, G34, G17 extendido con glicina, G34 extendido con glicina) derivadas de la progastrina. Ver la figura 1. El gen de la gastrina codifica un producto de 101 aminoácidos, la preprogastrina. Una primera escisión elimina un péptido señal de 21 residuos de aminoácidos (subrayado en la figura 1) y resulta en PG, un péptido de 80 aminoácidos. La secuencia entendida conocida de la secuencia polipeptídica de la PG humana (hPG) se proporciona en SEC ID nº: 20. Como se ilustra en la figura 1, los residuos de aminoácidos de hPG están numerados de 1 a 80, siendo el residuo más amino la posición 1. Se hace referencia a las secuencias en los primeros 40 aminoácidos de la progastrina como "N-terminales," mientras que se hace referencia a las secuencias que están en el residuo 41 a 80 como "C-terminales."

Estudios recientes han mostrado que los niveles de progastrina están elevados en pacientes con CRC. Bajo condiciones fisiológicas normales, la progastrina representa menos de 10% del péptido total secretado en los seres humanos. En el cáncer colorrectal, los niveles de progastrina están significativamente elevados tanto en plasma como en tejido tumoral, posiblemente como resultado de una expresión incrementada del gen de la gastrina acoplado con un procesamiento incompleto del producto génico. Un estudio mostró niveles significativamente altos en suero de progastrina en pacientes con CRC comparado con pacientes control pero no una diferencia tal para las formas más procesadas de la gastrina (Siddheshwar *et al.*, 2001, Gut 48: 47-52). En muestras de tumor de CRC sometidas a prueba, el 80-100% de las muestras mostró niveles incrementados de PG. Ver, por ejemplo, Ciccotosto *et al.*, 1995, Gastroenterology 109: 1142-1153; Baldwin *et al.*, 1998, Gut 42: 581-584; Van Solinge, 1993, Gastroenterology 104: 1099-1107. El papel de PG en CRC se ha sustanciado además por experimentos que muestran que los ratones que expresan PG humana recombinante tratados con el carcinógeno azoximetano tenían números significativamente mayores de focos de criptas aberrantes, adenomas, y adenocarcinomas en el colon comparado con ratones de tipo salvaje o ratones que expresan gastrinas amidadas (Singh *et al.* 2000, Gastroenterology 119: 162-171).

Recientemente, Hollande *et al.*, demostraron que la progastrina estimula la ruta beta-catenina/Tcf4 reprimiendo ICAT, un regulador negativo de la señalización beta-catenina/Tcf4 y que el bloqueo de la progastrina da lugar a la expresión *de novo* de ICAT. Ver el documento WO 2007/135542. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de funcionamiento, se cree que el bloqueo de la señalización de la progastrina da lugar a la represión de la proliferación inducida por beta-catenina/Tcf4 como resultado de una expresión incrementada de ICAT. En ausencia de señalización continuada dependiente de PG, la proliferación celular se inhibe y se desencadena la diferenciación celular y/o muerte celular (incluyendo la apoptosis).

A pesar de la necesidad urgente de nuevas estrategias clínicas para el tratamiento y diagnóstico de CRC, la evidencia de que PG estimula la proliferación de células de tumor de CRC, y a pesar de la atención incrementada en terapias de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer, hasta la fecha, no existen

publicaciones que demuestren que ningún anticuerpo monoclonal resulte apto para bloquear la proliferación de células tumorales dependiente de PG o incluso la unión de PG. Dichos anticuerpos, presentados en la presente memoria por primera vez, se han mostrado difíciles de desarrollar. Como un primer reto, en el contexto de la presente invención se descubre que la progastrina humana recombinante, que puede usarse para generar anticuerpos policlonales anti-hPG, no resulta apta para inducir una respuesta inmunógena monoclonal en ratones de ensayo. Por lo tanto, fue necesario diseñar inmunógenos usando sólo fragmentos peptídicos de PG para generar anticuerpos específicos para progastrina y no para otros productos del gen de la gastrina. Incluso una vez que los clones de hibridoma proporcionaron anticuerpos que se unían al péptido antigénico, se encontró que la unión al péptido no era predictiva de la capacidad para unirse a PG, específicamente o ni siquiera la unión.

Como se muestra con mayor detalle en los ejemplos a continuación, muchos hibridomas proporcionaron anticuerpos que se unían al péptido antigénico de PG usado en el inmunógeno pero no se unieron a PG. La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales anti-hPG que se unen no sólo al antígeno peptídico frente al que se generaron sino que también se unen a hPG específicamente. Bastante sorprendentemente, se obtuvieron anticuerpos monoclonales altamente específicos para hPG respecto a sus productos de procesamiento (por ejemplo, G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, CTFP) con antígenos que en algunos casos no eran únicos para hPG, sino que incluían regiones con secuencia de aminoácidos común a uno o más de los productos de procesamiento de la progastrina. Además, también se descubrió sorprendentemente que a pesar del tamaño relativamente pequeño de hPG (80 aminoácidos) no todos los anticuerpos monoclonales anti-hPG, incluso aquellos que presentan un alto grado de afinidad y especificidad para hPG, neutralizan su actividad biológica.

20 Anticuerpos monoclonales anti-hPG

En el contexto de la presente invención se han descubierto antígenos peptídicos útiles para generar anticuerpos monoclonales anti-hPG. Los péptidos útiles para generar anticuerpos anti-hPG de la presente descripción comprenden secuencias específicas de la progastrina no encontradas en las formas más procesadas del polipéptido, tales como gastrinas extendidas con glicina o amidadas o CTFP, pero también pueden comprender secuencias que se encuentran en las formas procesadas de hPG. En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se generan frente a un antígeno peptídico que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región N-terminal de hPG y se designan anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales. Una región antigénica ejemplificativa específica que puede usarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales corresponde a los residuos 1 a 14 de hPG (SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID nº: 25) acoplado con una secuencia conectora. En otras formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se generan frente a un antígeno peptídico que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región C-terminal de hPG y se designan anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales. Una región antigénica ejemplificativa específica que puede usarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG C-terminales corresponde a los residuos 55 a 80 de hPG (SEC ID nº: 27) acoplado a una secuencia conectora. Ver la tabla 1.

40 Los anticuerpos monoclonales anti-PG de la presente descripción se unen a PG y son útiles para detectar y aislar PG de mezclas complejas. Además, los anticuerpos monoclonales anti-PG de la descripción son excepcionalmente adecuados para aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico para cáncer colorrectal. En varias formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG (1) se unen específicamente a PG frente a otros productos del gen de la gastrina, (2) presentan una alta afinidad para hPG, (3) inhiben la proliferación de células de cáncer colorrectal *in vitro* e *in vivo*, (4) reducen el tamaño y número de los tumores *in vivo*, (5) detectan PG en mezclas complejas que contienen otros productos derivados del gen de la gastrina.

50 El gen de la gastrina se expresa y procesa extensamente, para proporcionar varios productos proteicos que presentan unas funciones en la homeostasis normal. La progastrina, por otra parte, típicamente no es detectable en la circulación de los sujetos sanos. Los anticuerpos monoclonales de la presente descripción se pretende que estén dirigidos a la progastrina pero no a otros péptidos derivados del gen de la gastrina. De acuerdo con esto, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen específicamente a la progastrina, de seres humanos y otros animales, pero no a otros productos del gen de la gastrina, tales como, pero no limitados a, gastrinas extendidas con glicina o amidadas o péptido flanqueante C-terminal (CTFP).

55 La especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG puede determinarse usando un ELISA como se expone a continuación. Se incuban placas de 96 pocillos toda la noche a 4°C con la concentración o concentraciones apropiadas del polipéptido de ensayo (por ejemplo, 25 y 50 ng de PG humana recombinante, y 50 y 250 ng de CTFP u otros productos derivados del gen de la gastrina) en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), después de lo cual los pocillos se lavan tres veces con disolución de lavado (PBS y 0,1% Tween-20), y se incuban durante 2 horas a 22°C con 100 µl de disolución de bloqueo (PBS, 0,1% Tween-20, 0,1% albúmina de suero bovino o hidrolizado de caseína) por pocillo. Después del bloqueo, los pocillos se lavan tres veces y se añade el anticuerpo que se va a someter a prueba (anticuerpo de ensayo). Se añaden a cada pocillo 100 µl del anticuerpo de ensayo (a 0,3 a 1 ng/ml) en PBS y 0,1% Tween-20, Las placas se incuban durante 2 horas a 22°C, después de lo cual la disolución del anticuerpo de ensayo se desecha y se reemplaza, después de una etapa de lavado (3X 100 µl de disolución de lavado, como se ha indicado anteriormente), con disolución de bloqueo que contiene un anticuerpo secundario, un anticuerpo IgG (Fc) de cabra antirratón acoplado a peroxidasa de rábano. Después de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario, se añaden 100 µl de

disolución de sustrato (por ejemplo Fast OPD, o dihidrocloruro de O-fenilendiamina, disponible en Sigma-Aldrich Co., preparado según las instrucciones del fabricante) a cada pocillo y se incuba en oscuridad durante 20 minutos a 22°C. La reacción se interrumpe por la adición de 50 µl de 4N ácido sulfúrico y se determina la cantidad de sustrato catalizada midiendo la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. La conversión del sustrato es

5 proporcional a la cantidad de anticuerpo primario (de ensayo) unido al antígeno. Los experimentos se hacen en duplicado y las medidas de DO se representan como una función de la concentración de antígeno. Los anticuerpos de ensayo se clasifican como específicos para PG si la D.O. medida es entre 0,2 y 1,5 para hPG y no existe una señal estadísticamente significativa por encima del fondo con CTFP o ninguno de los demás 10 péptidos derivados del gen de la gastrina, en el que el fondo es la señal media de los pocillos control que únicamente contienen PBS.

Se descubrió que varios anticuerpos monoclonales anti-hPG de la presente descripción eran altamente 15 específicos. En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG presentan una especificidad 100 veces mayor para la progastrina comparado con los demás productos del gen de la gastrina.

15 En dichas formas de realización, se requiere 100 veces más de antígeno (por ejemplo, gastrina extendida con glicina o amidada) para proporcionar la misma unión que la observada cuando el antígeno es la progastrina.

Otros métodos para determinar la unión incluyen, pero no están limitados a, un método inmunofluorescente, un 20 ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un inmunoensayo con material marcado radiactivamente (RIA), un ELISA sandwich (Monoclonal Antibody Experiment Manual (publicado por Kodansha Scientific, 1987), Second Series Biochemical Experiment Course, Vol. 5, Immunobiochemistry Research Method, publicado por Tokyo Kagaku Dojin (1986)).

25 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG con alta afinidad para PG son deseables tanto para usos terapéuticos como de diagnóstico. Para determinados usos, tales como usos terapéuticos, es deseable una afinidad de por lo menos aproximadamente 100 nM, aunque pueden ser deseables los anticuerpos que tienen afinidades mayores, por ejemplo afinidades de por lo menos aproximadamente 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, 10 pM, 1 pM, o incluso mayores. En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a 30 hPG con una afinidad en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 nM, o una afinidad en el intervalo entre cualquiera de los valores anteriores.

35 La afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG para hPG puede determinarse usando técnicas muy conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria, tales como a título de ejemplo no limitativo ELISA, calorimetría isotérmica de titulación (ITC), BIAcore, Proteon, o ensayo de polarización fluorescente.

40 Usando antígenos de las regiones N- o C-terminales de hPG, pueden generarse anticuerpos que reconozcan diferentes epítopos de hPG. El epítopo reconocido por un anticuerpo monoclonal dependerá del antígeno particular usado para generar el anticuerpo y puede mapearse usando técnicas conocidas para el experto en la materia, tales como escaneo de alanina y análisis SPOT (ver la sección de ejemplos a continuación). Por ejemplo, el mapeo de epítopos revela que anti-hPG MAb 2 y MAb 4 se unen al mismo epítopo; anti-hPG MAb 1 y MAb 3 se unen aproximadamente al mismo epítopo; MAb 17, MAb 18, MAb 19, y MAb 20 se unen aproximadamente al mismo epítopo; MAb 15 y MAb 16 se unen aproximadamente al mismo epítopo; anti-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb 9, y MAb 12 se unen al mismo epítopo y se unen aproximadamente al mismo epítopo que anti-hPG MAb 10; y anti-hPG MAb 11 y MAb 14 se unen aproximadamente al mismo epítopo.

45 Si un anticuerpo monoclonal anti-hPG reconoce o no un epítopo particular puede determinarse usando un ensayo de competición como se describe en la presente memoria, en el que se conoce el epítopo unido por el anticuerpo de referencia. En algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal anti-hPG compite con un anticuerpo de referencia que se une a un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región N-terminal de hPG. En formas de realización específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG compiten con un anticuerpo de referencia que se une a un epítopo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID nº: 28), residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID nº: 29), residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID nº: 30), residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID nº: 31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID nº: 32). En algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal anti-hPG compite con un anticuerpo de referencia que se une a un epítopo que presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región C-terminal de hPG. En formas de realización específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG compiten con un anticuerpo de referencia que se une a un epítopo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID nº: 33), residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID nº: 34), residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID nº: 35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID nº: 36).

50 60 Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden ser neutralizantes. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de funcionamiento, se cree que, a través de la unión a PG, los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes bloquean o inhiben su capacidad de interaccionar con su o sus pares de señalización. Esto, a su vez, inhibe una ruta de transducción de la señal en células de tumor colorrectal que de otra manera daría lugar a la proliferación, diferenciación celular reducida y muerte celular. En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes se unen a una región N-terminal de hPG. En formas de realización específicas, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes compiten por la unión a PG con

anti-hPG MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb 16, MAb 17, MAb 18, MAb 19, o MAb 20, En otras formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes se unen a una región C-terminal de hPG. En formas de realización específicas, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes compiten por la unión a PG con anti-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb21, MAb 22, o MAb23.

Un ensayo específico para comprobar si un anticuerpo monoclonal anti-PG es neutralizante puede llevarse a cabo como se expone a continuación. Se siembran células CRC LS174T en una placa de 6 pocillos, como se describe en el Ejemplo 7 a continuación, a aproximadamente 50000 células por pocillo. Las células se tratan a intervalos de 12 horas durante 48 horas con el anticuerpo monoclonal anti-PG de ensayo o un anticuerpo monoclonal control como se indica en el Ejemplo 7, a concentraciones de anticuerpo de aproximadamente 5 μ g/ml. Un anticuerpo de ensayo se define como neutralizante en el ensayo, si el número de células de cáncer CRC tratadas con el anticuerpo de ensayo muestra una reducción estadísticamente significativa de por lo menos 10% en el número de células supervivientes comparado con el número de células tratadas con un anticuerpo control, no específico, usando un ensayo de dos colas de Mann-Whitney (con las diferencias consideradas como significativas cuando $p<0,05$). Los números de células totales se corrigen por el número de células al comienzo del periodo de tratamiento, al que se hace referencia como T0.

Tal y como se usa en la presente memoria, un anticuerpo (Ab) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular, e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, modificados por ingeniería genética y formas modificadas de otra manera de anticuerpos, incluyendo pero de manera no limitativa anticuerpos híbridos, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos, incluyendo por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG, y scFv. En varias formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG comprenden toda o una parte de una región constante de un anticuerpo. En algunas formas de realización, la región constante es un isotipo seleccionado de entre: IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), e IgM.

El término “anticuerpo monoclonal” tal y como se usa en la presente memoria no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología del hibridoma. Un anticuerpo monoclonal deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, por cualquier medio disponible o conocido en la técnica. Los anticuerpos monoclonales útiles con la presente descripción pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de exposición en fagos, o una combinación de éstas. En muchos usos de la presente descripción, incluyendo el uso *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-hPG en seres humanos y los ensayos de detección *in vitro*, pueden usarse adecuadamente anticuerpos híbridos, primatizados, humanizados o humanos.

El término “scFv” se refiere a un anticuerpo de única cadena Fv en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional se han unido para formar una cadena.

Las referencias a “ V_H ” se refieren a la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv, o Fab. Las referencias a “ V_L ” se refieren a la región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Los anticuerpos (Abs) e inmunoglobulinas (Igs) son glucoproteínas que presentan las mismas características estructurales. Mientras los anticuerpos presentan especificidad de unión para una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de diana. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas nativas son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo.

Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR también se conocen como regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan el marco (FR). Como se conoce en la técnica, la posición/límite de aminoácidos que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de varias definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones en un dominio variable pueden apreciarse como posiciones hipervariables híbridas ya que puede considerarse que estas posiciones están en una región hipervariable bajo un conjunto de criterios mientras que puede considerarse que están fuera de una región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también pueden encontrarse en regiones hipervariables extendidas. La descripción proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, sobre todo adoptando una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen muy cerca por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, Sequences of

Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987).

Varios anticuerpos monoclonales anti-hPG que tienen una alta especificidad y afinidad para hPG y una buena actividad antitumoral se han identificado y sus CDR y cadenas variables pesada y ligera se han secuenciado. Se

5 hace referencia a los dominios variables de la cadena pesada y ligera murinos en la presente memoria como mV_H y mV_L seguido del número del anticuerpo monoclonal correspondiente, por ejemplo mV_H.3 y mV_L.3 para anti-hPG MAb3. Los anticuerpos monoclonales anti-hPG presentan tres CDR variables de cadena ligera y tres CDR variables de cadena pesada, a las que se hace referencia como V_H CDR1, 2, o 3, y V_L CDR1, 2, o 3, respectivamente, seguido del número del anticuerpo monoclonal anti-hPG ejemplificativo. Por ejemplo, V_L CDR1 de MAb 3 se indica como V_L CDR1.3 y V_H CDR1 de MAb 3 se indica como V_H CDR1.3. De manera similar, se hace referencia a los dominios variables de cadena pesada y ligera humanos en la presente memoria como hV_H y hV_L seguido del número del anticuerpo monoclonal correspondiente.

10 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG generados frente a una parte N-terminal de hPG presentan tres CDR variables de cadena ligera y tres CDR variables de cadena pesada, en los que V_L CDR1 se selecciona de entre QSIVHSNGNTY ("V_L CDR 1.3"; SEC ID nº: 4), QSLVHSSGVTY ("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); 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); 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); 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_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 20 ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEC ID nº: 44); y V_H CDR3 se selecciona de entre TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEC ID nº: 3), ATDGNYDWFAF ("V_H CDR 3.4" SEC ID nº: 9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEC ID nº: 47), y 25 AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEC ID nº: 48). Ver la tabla 1A.

30 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG generados frente a una parte C-terminal de hPG presentan tres CDR variables de cadena ligera y tres CDR variables de cadena pesada, en los que V_L CDR1 se selecciona de entre KSLRHTKGITF ("V_L CDR 1.8"; SEC ID nº: 49) y QSLLDSDGKTY ("V_L CDR 1.13"; SEC ID nº: 50); V_L CDR2 se selecciona de entre QMS ("V_L CDR 2.8"; SEC ID nº: 52) y LVS ("V_L CDR 2.13"; SEC ID nº: 53); V_L CDR3 se selecciona de entre AQNLELPLT ("V_L CDR 3.8"; SEC ID nº: 55) y 35 WQGTHFPQT ("V_L CDR 3.13"; SEC ID nº: 56); V_H CDR1 se selecciona de entre GFTFTTYA ("V_H CDR 1.8"; SEC ID nº: 37) y GFIFSSYHG ("V_H CDR 1.13"; SEC ID nº: 38); V_H CDR2 se selecciona de entre ISSGGTYT ("V_H CDR 2.8"; SEC ID nº: 41) y INTFGDRT ("V_H CDR 2.13"; SEC ID nº: 42); y V_H CDR3 se selecciona de entre ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEC ID nº: 45) y ARGTGTY ("V_H CDR 3.13"; SEC ID nº: 46). Ver la tabla 1B.

Tabla 1A

Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales								
Inmunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Secuencias CDR murinas			Secuencias V _H y V _L murinas		Secuencias V _H y V _L humanizadas (proyectado)
N1	43B9G11	MAb1						
N1	WE5H2G7	MAb2						
N2	6B5B11C 10	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	20D2C3G 2	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	ATDGNYDWFAF	(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)

Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales								
Inmunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Secuencias CDR murinas			Secuencias V _H y V _L murinas		Secuencias V _H y V _L humanizadas (proyectado)
			V _L CDR 2.4	KVS	(SEC ID nº 5)			
			V _L CDR 3.4	SQSTHVP PT	(SEC ID nº 11)			
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb1 5						
N2	1E9D9B6	MAb1 6	V _H CDR 1.16	GYTFTSY Y	(SEC ID nº 39)	mV _H 16	(SEC ID nº 61)	hV _H 16a (SEC ID nº: 84)
			V _H CDR 2.16	INPSNGG T	(SEC ID nº 43)			hV _H 16b (SEC ID nº: 86)
			V _H CDR 3.16	TRGGYY PFDY	(SEC ID nº 47)			hV _H 16c (SEC ID nº: 88)
			V _L CDR 1.16	QSLLDSD GKTY	(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	WQGTHS PYT	(SEC ID nº 57)			hV _L 16c (SEC ID nº: 89)
N2	1C8D10F 5	MAb1 7						
N2	1A7C3F11	MAb1 8						
N2	1B3B4F11	MAb1 9	V _H CDR 1.19	GYSITSD YA	(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	AREVNY GDSYHF DY	(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	VKKDGS H	(SEC ID nº 54)			hV _L 19b (SEC ID nº: 93)
			V _L CDR 3.19	GVGDAIK GQSVFV	(SEC ID nº 58)			hV _L 19c (SEC ID nº: 95)
N2	1C11F5E8	MAb2 0						

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

En la tabla 1A, todas las secuencias de aminoácidos están representadas usando la orientación convencional N→C. Para cada inmunógeno, el péptido progastrina se sintetizó con un conector de un residuo de ácido aminohexanoico (Ahx) seguido de una cisteína, que se conjugó con un vehículo de albúmina de suero bovino ("BSA") o hemocianina de lapa ("KLH").

5

Tabla 1B

Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales								
Inmunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Secuencias CDR murinas			Secuencias V _H y V _L murinas		Secuencias V _H y V _L humanizadas (proyectado)
C1	1B4A11D11 (I-4371)	MAb5						
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6						
C1	1B11E4B11 (I-4373)	MAb7						
C1	1C10D3B9	MAb8	V _H CDR 1.8	GFTFTT YA	(SEC ID nº 37)	mV _H .8	(SEC ID nº 59)	hV _H 8a (SEC ID nº 75)
			V _H CDR	ISSGGT YT	(SEC ID nº 41)			hV _H 8b (SEC ID nº 77)

Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales							
Inmunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Secuencias CDR murinas		Secuencias V_H y V_L murinas		Secuencias V_H y V_L humanizadas (proyectado)
			2.8				
			V_H CDR 3.8	ATQGNY SLDF	(SEC ID nº 45)		hV_H 8c (SEC ID nº 79)
			V_L CDR 1.8	KSLRHT KGITF	(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	AQNLEL PLT	(SEC ID nº 55)		hV_L 8c (SEC ID nº 76)
C1	1D8F5B3	MAb9					
C1	1E1C7B4	MAb10					
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11					
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12					
	2C6C3C7	MAb13	V_H CDR 1.13	GFIFSSY G	(SEC ID nº 38)	mV_H .13 (SEC ID nº 60)	hV_H .1 3a (SEC ID nº 80)
			V_H CDR 2.13	INTFGD RT	(SEC ID nº 42)		hV_H .1 3b (SEC ID nº 82)
			V_H CDR 3.13	ARGTGT Y	(SEC ID nº 46)		
			V_L CDR 1.13	QSLLDS DGKTY	(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	WQGTH FPQT	(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 están representadas usando la orientación convencional N→C. Para cada inmunógeno, el péptido progastrina se sintetizó con un conector de dos residuos de ácido aminohexanoico (Ahx) seguido de una cisteína, que se conjugó con un vehículo de hemocianina de lapa ("KLH") o toxina de difteria ("DT").

En algunas formas de realización, las CDR de la cadena pesada V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.3, V_H CDR2.3 y V_H CDR3.3. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_H .3 (SEC ID nº: 12). Ver la figura 2A.

En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_L CDR1.3, V_L CDR2.3 y V_L CDR3.3. En una forma de realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG presenta una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_L .3 (SEC ID nº: 13). Ver la figura 2B.

En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.4, V_H CDR2.4 y V_H CDR3.4. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG presenta una secuencia correspondiente a mV_H .4 (SEC ID nº: 14). Ver la figura 2C.

En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_L CDR1.4, V_L CDR2.4 y V_L CDR3.4. En una forma de realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .4 (SEC ID nº: 15). Ver la figura 2D.

5 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.8, V_H CDR2.8 y V_H CDR3.8. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a m V_H .8 (SEC ID nº: 59). Ver la figura 2E.

10 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_L CDR1.8, V_L CDR2.8 y V_L CDR3.8. En una forma de realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .8 (SEC ID nº: 63). Ver la figura 2F.

15 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.13, V_H CDR2.13 y V_H CDR3.13. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a m V_H .13 (SEC ID nº: 60). Ver la figura 2G.

20 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_L CDR1.13, V_L CDR2.13 y V_L CDR3.13. En una forma de realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .13 (SEC ID nº: 64). Ver la figura 2H.

25 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.16, V_H CDR2.16 y V_H CDR3.16. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a m V_H .16 (SEC ID nº: 61). Ver la figura 2I.

30 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_L CDR1.16, V_L CDR2.16 y V_L CDR3.16. En una forma de realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .16 (SEC ID nº: 65). Ver la figura 2J.

35 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_L CDR1.19, V_L CDR2.19 y V_L CDR3.19. En una forma de realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente m V_L .19 (SEC ID nº: 66). Ver la figura 2L.

40 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.3, V_H CDR2.3 y V_H CDR3.3 y las CDR de la cadena V_L son V_L CDR1.3, V_L CDR2.3 y V_L CDR3.3. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_H .3 (SEC ID nº: 12) y la cadena V_L tiene una secuencia correspondiente a m V_L .3 (SEC ID nº: 13).

45 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.4, V_H CDR2.4 y V_H CDR3.4 y las CDR de la cadena V_L son V_L CDR1.4, V_L CDR2.4 y V_L CDR3.4. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_H .4 (SEC ID nº: 14) y una cadena V_L tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .4 (SEC ID nº: 15).

50 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.8, V_H CDR2.8 y V_H CDR3.8 y las CDR de la cadena V_L son V_L CDR1.8, V_L CDR2.8 y V_L CDR3.8. En una forma de realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAb 8 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_H .8 (SEC ID nº: 59) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .8 (SEC ID nº: 63).

55 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.3, V_H CDR2.13 y V_H CDR3.13 y las CDR de la cadena V_L son V_L CDR1.13, V_L CDR2.13 y V_L CDR3.13. En una forma de realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAb 13 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_H .13 (SEC ID nº: 60) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .13 (SEC ID nº: 64).

60 En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.16, V_H CDR2.16 y V_H CDR3.16 y las CDR de la cadena V_L son V_L CDR1.16, V_L CDR2.16 y V_L CDR3.16. En una forma de realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAb 16 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_H .16 (SEC ID nº: 61) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .16 (SEC ID nº: 65).

En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_H CDR1.19, V_H CDR2.19 y V_H CDR3.19 y las CDR de la cadena V_L son V_L CDR1.19, V_L CDR2.19 y V_L CDR3.19. En una forma de realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAbs 19 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_H .19 (SEC ID nº: 62) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a m V_L .19 (SEC ID nº: 66).

5 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción incluyen tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F (ab')₂) que resultan aptos para unirse específicamente a hPG. Los fragmentos Fab y F (ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente 10 de la circulación del animal o planta y pueden tener menos unión inespecífica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, 1983, *J. Nucl. Med.* 24: 316). Los fragmentos de anticuerpo son útiles por lo tanto en aplicaciones terapéuticas entre otras aplicaciones.

15 El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a la diana o variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂ y Fv. Un fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a la diana. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en una asociación firme, no covalente (dímero V_H - V_L). Es en esta configuración en la 20 que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a la diana en la superficie del dímero V_H - V_L . Frecuentemente, las seis CDR confieren especificidad de unión a la diana al anticuerpo. Sin embargo, en algunos casos incluso un único dominio variable (o mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR 25 específico para una diana) puede tener la capacidad de reconocer y unirse a la diana, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión completo. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena de polipeptido. Generalmente, el polipeptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los 30 dominios V_H y V_L que permite a scFv formar la estructura deseada para la unión a la diana. Los "anticuerpos de dominio único" están compuestos por un único dominio V_H o V_L que presenta suficiente afinidad para hPG. En una forma de realización específica, el anticuerpo de dominio único es un anticuerpo camelizado (ver, por ejemplo, Riechmann, 1999, *Journal of Immunological Methods* 231: 25-38).

35 30 El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH_1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F (ab') se producen por la escisión del puente disulfuro de las cisteínas bisagra del 35 producto de digestión con pepsina F (ab')₂. Los acoplamientos químicos adicionales de los fragmentos de anticuerpo son conocidos por los expertos en la materia.

40 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden ser anticuerpos híbridos. El término anticuerpo "híbrido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina no humana, tal como anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulinas humanas, seleccionadas típicamente de un molde de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos híbridos se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Morrison, 1985, *Science* 229(4719): 1202-7; Oi *et al.* 1986, *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies *et al.* 1985, *J. Immunol. Methods* 125: 191-202; US nº 5.807.715; nº 4.816.567; y nº 4.816.397.

45 45 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden ser humanizados. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab', F (ab')₂ u otras subsecuencias de unión a la diana de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. En 50 general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o 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 FR son las de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana, y pueden denominarse "injertadas con CDR." El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una parte de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la humanización de anticuerpos, incluyendo los métodos para diseñar anticuerpos humanizados, se conocen en la técnica. Ver, 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; nº 5.585.089; nº 5.693.761; nº 5.693.762; y nº 6.180.370 de Queen *et al.*; 55 documento EP 239 400; publicación PCT WO 91/09967; patente US nº 5.225.539; documentos EP 592 106; EP 519 596; 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.

60 65 Las secuencias para anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados se diseñaron a partir de anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos de la presente descripción como se describe en los Ejemplos a continuación. Las formas de realización específicas de anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que comprenden: (1) cualquiera de tres VL CDR y cualquiera de tres VH CDR descritas en la presente memoria; (2) una región

variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 22; (3) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos

5 correspondiente a SEC ID nº: 24; (4) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 75, 77, y 79 y una región variables de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 76 y 78; (5) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 80 y 82 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 81 y 83; (6) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 84, 86, y 88 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 85, 87, y 89; (7) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 90, 92, y 94 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 91, 93, y 95.

10 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden ser primatizados. El término "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los métodos para producir anticuerpos primatizados son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.658.570; nº 5.681.722; y nº 5.693.780.

15 Incluidos en los anticuerpos monoclonales anti-hPG están los anticuerpos que compiten con un anticuerpo de referencia, tal como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal anti-hPG o cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria. Los anticuerpos que compiten con los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción son útiles para varias aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Las formas de realización específicas de anticuerpos monoclonales anti-hPG de referencia adecuados incluyen los anticuerpos descritos en la presente memoria, a título de ejemplo no limitativo, anticuerpos que comprenden cualesquiera tres VL CDR y cualesquiera tres VH CDR descritas en la presente memoria; anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 12 (mVH.3) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 13 (mVL.3); y anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 14 (mVH.4) y la cadena VL tiene una secuencia correspondiente a SEC ID nº: 15 (mVL.4), anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 59 (mVH.8) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 63 (mVL.8); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 60 (mVH.13) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 64 (mVL.13); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 61 (mVH.16) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 65 (mVL.16); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 62 (mVH.19) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº: 66 (mVL.19) o cualquier combinación de cadenas VH y VL divulgadas en la presente memoria.

20 Los anticuerpos de referencia adecuados también incluyen anticuerpos producidos por un hibridoma seleccionado de entre el grupo que consiste en 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9; anticuerpos que se unen a un epítopo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID nº: 28), residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID nº: 29), residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID nº: 30), residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID nº: 31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID nº: 32); y anticuerpos que se unen a un epítopo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID nº: 33), residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID nº: 34), residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID nº: 35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID nº: 36).

25 La capacidad para competir con un anticuerpo monoclonal de la presente descripción para unirse a PG, por ejemplo hPG, puede ensayarse usando un ensayo de competición como sigue. Se recubren placas de 96 pocillos con un anticuerpo de captura (anticuerpo policlonal o monoclonal que reconoce una región N o C terminal de la progastrina que difiere del epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal de referencia), a una concentración que se debe seleccionar en el intervalo de 1-10 µg/ml, toda la noche a 4°C (0,1 a 1 µg/pocillo). Despues de bloquear con 0,1% Tween-20/0,1% BSA en PBS (amortiguador de bloqueo) durante 2h a 22°C, se añade progastrina humana recombinante a una concentración de 10 pM a 1 nM (10 a 1000 pg/pocillo) y se incuba durante 2h a 22°C. Posteriormente, el anticuerpo monoclonal anti-hPG biotinilado de referencia o una mezcla que contiene el anticuerpo monoclonal de referencia se añade junto con concentraciones crecientes de anticuerpos de ensayo no marcados y se incuba durante 1 horas a 22°C. Despues de lavar, la detección se lleva a cabo incubando durante 1h a 22°C con un sustrato fluorogénico para peroxidasa de rábano, seguido de la cuantificación de las unidades relativas de luz (RLU) en un luminómetro. Los ensayos se llevan a cabo en duplicado. Los anticuerpos que compiten con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia de la presente descripción inhiben la unión del anticuerpo de referencia a hPG. Un anticuerpo que se une al mismo epítopo que

los anticuerpos control resulta apto para competir eficazmente para la unión y así reducirá significativamente (por ejemplo, por lo menos un 50%) la unión del anticuerpo de referencia, como se manifiesta por una reducción en el marcaje unido. La reactividad de los anticuerpos de referencia (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante será el valor alto de control. El valor bajo de control se obtendrá incubando los

5 anticuerpos de ensayo no marcados con células que expresan la progastrina e incubando la mezcla célula/anticuerpo con anticuerpos control marcados de exactamente el mismo tipo, en el que ocurrirá la competición y la unión reducida de los anticuerpos marcados. En un ensayo de ensayo, una reducción significativa de la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce sustancialmente el mismo epítopo.

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

$$Ki = CI50/(1 + [\text{Concentración de Ab de referencia}]/Kd)$$

15 En la que $CI50$ del anticuerpo de ensayo es la concentración del anticuerpo de ensayo que proporciona un 50% de reducción en la unión del anticuerpo de referencia y Kd es la constante de disociación del anticuerpo de referencia, una medida de su afinidad por la progastrina. Los anticuerpos que compiten con los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria pueden tener una Ki de 10 pM a 10 nM bajo las

20 condiciones de ensayo descritas en la presente memoria.

En varias formas de realización, un anticuerpo monoclonal anti-hPG no marcado de la descripción reduce la unión del anticuerpo de referencia marcado por lo menos un 40%, por lo menos un 50%, por lo menos un 60%, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, un 100%, o un porcentaje en el intervalo entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción reduce la unión del anticuerpo de referencia marcado un 50% a 70%) cuando el anticuerpo monoclonal anti-hPG se usa a una concentración de 0,01 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,4 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml o a una concentración en el intervalo entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, a una concentración en el intervalo de 2 µg/ml a 10 µg/ml).

30 En la realización de un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo de referencia y cualquier anticuerpo de ensayo (independientemente de especie o isotipo), se puede marcar en primer lugar la referencia con un marcaje detectable, tal como biotina o un marcaje enzimático (o incluso radiactivo) para permitir la identificación posterior. En este caso, el anticuerpo de referencia marcado (en concentraciones fijas o crecientes) 35 se incuba con una cantidad conocida de progastrina. El anticuerpo de ensayo no marcado se añade al complejo preunido de progastrina y el anticuerpo marcado. Se mide la intensidad del marcaje unido. Si el anticuerpo de ensayo compite con el anticuerpo marcado para la unión a un epítopo superpuesto, la intensidad disminuirá respecto a la unión del anticuerpo control marcado en ausencia del anticuerpo de ensayo.

40 Los ensayos de competición son conocidos y pueden adaptarse para proporcionar unos resultados comparables con el ensayo descrito anteriormente. El ensayo puede ser uno cualquiera de un intervalo de ensayos inmunológicos basados en la competición de anticuerpos, y los anticuerpos de referencia se detectarán mediante la detección de su marcaje, por ejemplo, usando estreptavidina en el caso de anticuerpos biotinilados o usando un sustrato cromogénico respecto a un marcaje enzimático (tal como sustrato 3,3'5,5'-tetrametilbencidina (TMB) 45 con la enzima peroxidasa) o simplemente detectando un marcaje radiactivo o un marcaje fluorescente.

También se incluyen en la presente memoria anticuerpos monoclonales anti-hPG que son derivados, modificados covalentemente, o conjugados con otras moléculas, para usarse en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. A título de ejemplo no limitativo, los anticuerpos derivados incluyen anticuerpos que han sido 50 modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas puede realizarse por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

55 En otro ejemplo, los anticuerpos de la presente descripción pueden unirse a restos de poli (etilenglicol) (PEG). En una forma de realización específica, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y los restos PEG están unidos mediante cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional terminal de aminoácidos localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino libre, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Dichos 60 aminoácidos pueden estar presentes de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse por ingeniería en el fragmento usando métodos de ADN recombinante. Ver, por ejemplo la patente US nº 5.219.996. Pueden usarse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG. Los restos PEG pueden unirse covalentemente mediante un grupo tiol de por lo menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se usa un grupo tiol como el punto de unión, pueden usarse restos efectores apropiadamente activados, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína.

En un ejemplo específico, un conjugado de un anticuerpo monoclonal anti-hPG es un fragmento Fab' modificado que está PEGilado, es decir, tiene PEG (poli (etilenglicol)) unido covalentemente a él, por ejemplo, según el método descrito en EP0948544. Ver también Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry and

5 Biological Applications, (J. Milton Harris y S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); y Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam y A. Dent, eds., Grove Publishers, Nueva York, 1998); y Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54: 531-545. El PEG puede estar unido a un cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab' modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amino del residuo de lisina 10 puede unirse un polímero metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab' puede ser por lo tanto aproximadamente 40000 Da.

15 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG incluyen anticuerpos marcados, útiles en aplicaciones de diagnóstico.

20 Los anticuerpos pueden usarse para el diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de una diana de interés en células específicas, tejidos o suero; o para monitorizar el desarrollo o progresión de una respuesta inmunológica como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable o "marcaje." Un marcaje puede conjugarse directamente o indirectamente con un anticuerpo

25 monoclonal anti-hPG de la descripción. El marcaje puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcas con radioisótopos, marcas isotópicos, o marcas fluorescentes) o, en el caso de un marcaje enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando varias

30 tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al anticuerpo (o fragmento de éste) o indirectamente, mediante un intermediario (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Los ejemplos de marcas enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y

35 luciferasa bacteriana; patente US nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidrofotazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasa (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasa heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y semejantes. Los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen

40 umbelliferonas, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, cloruro de dimetilamina-1-nafalensulfonilo, o ficoeritrina y similares, un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol, los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, los ejemplos de materiales isotópicos adecuados incluyen ^{13}C , ^{15}N , y deuterio, y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

45 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de todas las especies de origen están incluidos en la presente invención. Los anticuerpos naturales ejemplificativos no limitativos incluyen anticuerpos derivados de seres humanos, simios, pollo, cabras, conejos y roedores (por ejemplo, ratas, ratones y hámsteres) (Ver, por ejemplo, Lonberg *et al.*, documento WO93/12227; patente US nº 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, documento WO 91/10741; patente US nº 6.150.584). Los anticuerpos naturales son anticuerpos producidos por un animal hospedante después de haber sido inmunizado con un antígeno, tal como un polipéptido.

Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

50 La presente divulgación comprende moléculas de ácido nucleico que codifican genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas para anticuerpos monoclonales anti-hPG, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y células hospedadoras que pueden producir los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la divulgación.

55 Un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción puede prepararse por la expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas en una célula hospedadora. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula hospedadora se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de manera que las cadenas ligera y pesada se expresan en la célula hospedadora y, opcionalmente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras, medio del cual pueden recuperarse los anticuerpos. Las

60 metodologías de ADN recombinante estándar se usan para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células hospedadoras, tales como las descritas en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. *et al.*, eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la patente US nº 4.816.397.

65 Para generar ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos monoclonales anti-hPG, se obtienen en primer lugar fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Estos ADN pueden

obtenerse por amplificación y modificación de ADN de estirpe germinal o ADNc que codifica secuencias variables de cadena ligera y pesada, por ejemplo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de ADN de estirpe germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera se conocen en la técnica (Véanse, 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; la base de datos de secuencias de la estirpe germinal humana "VBASE"; ver también Kabat, E. A. *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242; Tomlinson *et al.* 1992, J. Mol. Biol. 22T: 116-198; y Cox *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24: 827-836).

5 Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L relacionados con el anticuerpo monoclonal anti-hPG, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une de manera funcional a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. El término "unido de manera funcional," tal y como se usa en este contexto, se pretende que signifique que los dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

10 15 Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L relacionados con el anticuerpo monoclonal anti-hPG, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une de manera funcional a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. El término "unido de manera funcional," tal y como se usa en este contexto, se pretende que signifique que los dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

20 25 30 El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa por unión de manera funcional del ADN que codifica V_H con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH_1 , CH_2 , CH_3 y, opcionalmente, CH_4). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242) y los fragmentos de ADN que comprenden estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM o IgD, pero en determinadas formas de realización es una región constante de IgG₁ o IgG₄. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse de manera funcional con otra molécula de ADN que codifica únicamente la región constante CH_1 de cadena pesada.

35 40 45 El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) por la unión de manera funcional del ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242)) y los fragmentos de ADN que comprenden estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero en determinadas formas de realización es una región constante kappa. Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen de manera funcional con otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃ (SEC ID nº: 99), de manera que las secuencias de V_H y V_L pueden expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el conector flexible (Ver, por ejemplo, Bird *et al.*, 1988, Science 242: 423-426; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348: 552-554).

50 55 Para expresar los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción, los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se insertan en vectores de expresión de manera que los genes están unidos de manera funcional con secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, el término "unido de manera funcional" se pretende que signifique que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción en el vector cumplen su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para ser compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de la cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

60 65 Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándares (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligadura de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de la cadena ligera o pesada relacionada con el anticuerpo monoclonal anti-hPG, el vector de expresión puede portar ya secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia para convertir las secuencias V_H y V_L relacionadas con el anticuerpo monoclonal anti-hPG en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera, respectivamente, de manera que el segmento V_H está unido de manera funcional al o a los segmentos CH en el vector y el segmento V_L está unido de manera funcional al segmento CL en el vector. Además o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción

de la cadena de anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal está unido en marco con el extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

5 Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la descripción portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. El término "secuencia reguladora" se pretende que incluya promotores, amplificadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o amplificadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/amplificador CMV), Virus de Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/amplificador SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una mayor descripción de los elementos reguladores virales, y secuencias de éstos, ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.168.062 por Stinski, US nº 4.510.245 por Bell *et al.*, y US nº 4.968.615 por Schaffner *et al.*

25 Además de los genes de cadena de anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la descripción pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcadores seleccionables. El gen de marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que el vector se ha introducido (Véanse, por ejemplo, patentes US nº 4.399.216, nº 4.634.665 y nº 5.179.017, todas por Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen de marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes de marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usarse en células hospedadoras DHFR^r con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418). Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfecan en una célula hospedadora por técnicas estándares. Las distintas formas del término "transfección" se pretende que comprendan una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en unas células hospedadoras procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares.

40 Es posible expresar los anticuerpos de la descripción en células hospedadoras procariotas o eucariotas. En determinadas formas de realización, la expresión de los anticuerpos se realiza en células eucariotas, por ejemplo, células hospedadoras de mamíferos, para la secreción óptima de un anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo. Las células hospedadoras de mamíferos exemplificativas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO DHFR^r, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que crecen las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándares. Las células hospedadoras también pueden usarse para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Debe apreciarse que las variaciones del procedimiento anterior están en el alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la presente divulgación.

60 La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para eliminar parte o todo el ADN que codifica una o las dos cadenas ligera y pesada que no es necesaria para la unión a hPG. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas truncadas de ADN también están comprendidas por los anticuerpos de la divulgación.

65 Para la expresión recombinante de un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción, la célula hospedadora puede cotransfектarse con dos vectores de expresión de la divulgación, un primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos o cada uno puede contener un marcador seleccionable separado. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera.

Una vez que un ácido nucleico codifica una o más partes de un anticuerpo monoclonal anti-hPG, pueden introducirse alteraciones o mutaciones adicionales en la secuencia codificadora, por ejemplo para generar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos con diferentes secuencias CDR, anticuerpos con una afinidad reducida para el receptor Fc o anticuerpos de diferentes subclases.

5 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción también pueden producirse por síntesis química (por ejemplo, por los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2^a ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Los anticuerpos variantes también pueden generarse usando una plataforma sin células (ver, por ejemplo, Chu *et al.*, Biochemia nº 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)).

10 Una vez que se ha producido un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de columna de intercambio iónico, de afinidad y de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la presente descripción o fragmentos de éstos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la técnica para facilitar la purificación.

15 Una vez aislado, el anticuerpo monoclonal anti-hPG puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (ver, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia).

20 La presente divulgación proporciona células hospedadoras que pueden producir anticuerpos monoclonales anti-hPG. Las células hospedadoras pueden ser células modificadas por ingeniería usando técnicas de ADN recombinante para expresar genes que codifican genes de cadena pesada y ligera o hibridomas derivados de un organismo adecuado y seleccionados por la capacidad de producir los anticuerpos deseados.

25 Las células hospedadoras aptas para producir anticuerpos monoclonales anti-PG pueden ser hibridomas. Los métodos para generar hibridomas son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975, Nature 256: 495) y un ejemplo se proporciona a continuación. Generalmente, un animal hospedador, tal como un ratón se inmuniza con un inmunógeno, tal como un péptido de interés, para inducir el desarrollo de linfocitos, por ejemplo células del bazo, que producen anticuerpos aptos para unirse específicamente al inmunógeno. Alternativamente, los linfocitos aislados, incluyendo células del bazo, células de ganglios linfáticos o linfocitos de sangre periférica, pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan con una estirpe celular inmortalizada, tal como una estirpe celular de mieloma, usando un agente de fusión adecuado (por ejemplo, polietilenglicol), para formar una estirpe celular de hibridoma. Las estirpes celulares inmortalizadas adecuadas pueden ser de origen mamífero, tal como murino, bovino o humano. Las células de hibridoma se cultivan en cualquier medio adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células no inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, cuando se usan las células parentales que carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), las fusiones pueden crecer en un medio que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio "HAT") que inhibe el crecimiento de las células parentales, no fusionadas.

30 Una vez aislado, el anticuerpo monoclonal anti-hPG puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (ver, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia)).

35 Una vez que se ha producido un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de columna de intercambio iónico, de afinidad y de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la presente descripción o fragmentos de éstos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la técnica para facilitar la purificación.

40 Una vez aislado, el anticuerpo monoclonal anti-hPG puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (ver, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia)).

45 Una vez aislado, el anticuerpo monoclonal anti-hPG puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (ver, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia)).

50 Una vez aislado, el anticuerpo monoclonal anti-hPG puede, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento (ver, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia)).

55 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales tienen CDR de cadena ligera variable (V_L) que corresponden a la V_L del anticuerpo monoclonal que se puede obtener de los hibridomas 43B9G11 (que producen anti-hPG MAb 1), WE5H2G7 (que producen anti-hPG MAb 2), 6B5B11C10 (que producen anti-hPG MAb 3), 20D2C3G2 (que producen anti-hPG MAb 4), 1E9A4A4 (que producen anti-hPG MAb 15), 1E9D9B6 (que producen anti-hPG MAb 16), 1C8D10F5 (que producen anti-hPG MAb 17), 1A7C3F11 (que producen anti-hPG MAb 18), 1B3B4F11 (que producen anti-hPG MAb 19), y 1C11F5E8 (que producen anti-hPG MAb 20).

60 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales tienen CDR de V_L y V_H que corresponden a las CDR de V_L y V_H de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de los hibridomas anteriores.

65 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales tienen CDR de V_L que corresponden a la V_L del anticuerpo monoclonal que se puede obtener de los hibridomas 1B4A11D11 (que producen anti-hPG MAb 5), 1B6A11F2 (que producen anti-hPG MAb 6), 1B11E4B11 (que producen anti-hPG MAb 7), 1C10D3B9 (que producen anti-hPG MAb 8), 1D8F5B3 (que producen anti-hPG MAb 9), 1E1C7B4 (que producen anti-hPG MAb 10), 2B4C8C8 (que producen anti-hPG MAb 11), 2B11E6G4 (que producen anti-hPG MAb 12), 2C6C3C7 (que producen anti-hPG MAb 13), 2H9F4B7 (que producen anti-hPG MAb 14), 1F11F5E10 (que producen anti-hPG MAb 21), 1F11F5G9 (que producen anti-hPG MAb 22), y 1A11F2C9 (que producen anti-hPG MAb 23).

70 En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales tienen CDR de V_L y V_H que corresponden a las CDR de V_L y V_H de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de los hibridomas anteriores.

hibridomas anteriores.

En una forma de realización, se proporciona una célula hospedadora apta para producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID nº: 12 y una región variable de

5 cadena ligera que comprende SEC ID nº: 13. En una forma de realización, se proporciona una célula hospedadora apta para producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID nº: 14 y una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID nº: 15. En una forma de realización, se proporciona una célula hospedadora apta para producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID nº: 59 y una región variable de

10 cadena ligera que comprende SEC ID nº: 63. En una forma de realización, se proporciona una célula hospedadora apta producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID nº: 60 y una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID nº: 64. En una forma de realización, se proporciona una célula hospedadora apta para producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID nº: 61 y una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID nº: 65. En una forma de realización, se proporciona una célula hospedadora apta para producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEC ID nº: 62 y una región variable de cadena ligera que comprende SEC ID nº: 66.

20 En algunas formas de realización, se proporciona una célula hospedadora de la descripción que comprende un ácido nucleico seleccionado de entre: una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la región variable de cadena pesada de SEC ID nº: 12, 14, 59, 60, 61, y 62; y un ácido nucleico seleccionado de entre: una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la región variable de cadena ligera de SEC ID nº: 13, 15, 63, 64, 65, y 66. En algunas formas de realización, la región variable de cadena pesada está codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre: SEC ID nº: 16, 18, 67, 68, 69 y 70, En algunas formas de

25 realización, la región variable de cadena ligera está codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre: SEC ID nº: 17, 19, 71, 72, 73, y 74.

30 En algunas formas de realización, se proporcionan secuencias polinucleotídicas que codifican una región variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal anti-hPG humanizado. Las formas de realización específicas incluyen polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº: 21, 23, 75, 77, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, y 94. En algunas formas de realización, se proporcionan secuencias polinucleotídicas que codifican una región variable de cadena ligera de un anticuerpo monoclonal anti-hPG humanizado. Las formas de realización específicas incluyen polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el

35 grupo que consiste en SEC ID nº: 22, 24, 76, 78, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, y 95.

Actividades biológicas de los anticuerpos monoclonales anti-hPG

40 Se ha implicado a PG en la supervivencia y/o proliferación de células de tumor de CRC. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de operación, se piensa que, a través de la unión a PG, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes bloquean o inhiben la capacidad de PG de interaccionar con su o sus parejas de señalización. Esto, a su vez, bloquea o inhibe las respuestas celulares a la progastrina, tal como proliferación celular, diferenciación celular reducida y/o muerte celular reducida, y/o crecimiento tumoral. Como consecuencia de estas actividades, los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes de la descripción

45 pueden usarse en una variedad de contextos *in vitro*, *in vivo*, y *ex vivo* para unirse a PG y bloquear la señalización dependiente de PG.

50 De acuerdo con esto, la divulgación proporciona métodos para inhibir las respuestas dependientes de PG en células de CRC. Generalmente, los métodos comprenden poner en contacto una célula de CRC con, o exponer una población de células a, un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante en una cantidad eficaz para inhibir una o más de las respuestas inducidas por PG de células de CRC, por ejemplo proliferación y/o supervivencia de células de CRC. La proliferación, o inhibición de ésta, *in vitro* e *in vivo* puede determinarse según los ensayos para medir incrementos en el número de células, número de tumores o tamaño de los tumores en el tiempo. Los ensayos para la inhibición de la proliferación de células y tumores son muy conocidos en la técnica.

55 55 El bloqueo de la señalización dependiente de PG puede inhibir la supervivencia de las células de CRC mediante el incremento de la muerte celular. La inhibición de la supervivencia de las células de CRC *in vitro* o *in vivo* puede determinarse midiendo la reducción del número de células de cáncer de hígado en el tiempo (por ejemplo, 24 o 48 horas). Los ensayos para muerte celular son muy conocidos en la técnica. Además, un ejemplo de un ensayo de supervivencia celular se proporciona en la presente memoria.

60 Los estudios sugieren además que la inhibición de la señalización dependiente de PG en células de tumor de CRC puede inhibir la supervivencia de las células de CRC desencadenando la muerte celular programada, o apoptosis. La inducción de la apoptosis puede determinarse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo de manera no limitativa medir cambios en la expresión de genes que tienen actividad pro- o antiapoptótica. Por ejemplo, un incremento de la expresión en el tiempo (por ejemplo, 48 horas) de un gen proapoptótico, tal como, por ejemplo, Bax, es indicativo de un incremento de la apoptosis. De manera similar,

una disminución de la expresión en el tiempo (por ejemplo, 72 o 96 horas) de un gen antiapoptótico, tal como a título de ejemplo no limitativo, Bcl-2, es indicativa de un incremento de la apoptosis. Las técnicas para medir cambios en la expresión génica, tal como PCR cuantitativa en tiempo real, son muy conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Hollande *et al.*, documento WO 2007/135542.

5 La inhibición de la señalización dependiente de progastrina también estimula la diferenciación celular. De acuerdo con esto, los métodos para inhibir la proliferación y/o supervivencia de las células de CRC comprende administrar una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante eficaz para inducir la diferenciación de las células de CRC *in vitro* o *in vivo*. La diferenciación de las células de CRC puede determinarse midiendo incrementos en el tiempo (por ejemplo, 24 o 48 horas) de la expresión de marcadores genéticos para la diferenciación celular, tales como, a título de ejemplo no limitativo, Muc-2 u otros marcadores para células intestinales diferenciadas (por ejemplo, células caliciformes). Los cambios en la expresión génica pueden medirse por cualquier medio conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, Hollande *et al.*, documento WO 2007/135542. También pueden ensayarse otros genes cuya expresión o represión sea dependiente de PG, tales como ICAT, usando métodos estándares. ver id.

Composiciones farmacéuticas

20 Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden formularse en composiciones. Opcionalmente, las composiciones que pueden comprender uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los segundos agentes terapéuticos descritos a continuación, se proporcionan en la presente memoria. Las composiciones se suministrarán habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado para administrarla a un paciente).

25 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden administrarse a un paciente por una variedad de rutas tales como ruta oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intraocular, tópica, intratecal e intracerebroventricular. La ruta más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del anticuerpo particular, del sujeto y de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y del estado físico 30 del sujeto. El anticuerpo puede formularse como una disolución acuosa y administrarse por inyección subcutánea.

35 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contiene una cantidad predeterminada de un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción por dosis. Dicha unidad puede contener a título de ejemplo no limitativo 5 mg a 5 g, por ejemplo 10 mg a 1 g, o 20 a 50 mg. Los 40 vehículos farmacéuticamente aceptables para su utilización en la descripción pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo, por ejemplo, de la afección que se va a tratar o de la ruta de administración.

45 Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales típicamente utilizados en la técnica (todos los cuales se refieren en la presente memoria como "vehículos"), es decir, agentes de amortiguación, agentes estabilizadores, conservantes, isotonificadores, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos misceláneos. Ver, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones utilizadas.

50 Los agentes de amortiguación ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes en una concentración que varía de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes de amortiguación adecuados para su utilización en la presente descripción incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos tales como amortiguadores 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.), amortiguadores 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.), amortiguadores 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.), amortiguadores 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.), amortiguadores gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gliconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gliconato de potasio, etc.), amortiguador 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.), amortiguadores lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y amortiguadores acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Además, pueden usarse amortiguadores fosfato, amortiguadores histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

65 Pueden añadirse conservantes para retrasar el crecimiento microbiano y pueden añadirse en cantidades comprendidas entre 0,2% y 1% (p/v). Los conservantes adecuados para su utilización con la presente

descripción incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, y alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3-pentanol. Los isotonificantes conocidos algunas veces como "estabilizadores" pueden añadirse para asegurar la

5 isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente descripción e incluyen alcoholes de azúcar polihídricos, por ejemplo alcoholes de azúcar trihídricos o mayores, tales como glicerina, eritritol, arabinol, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función desde un agente de volumen hasta un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda en la prevención de la
10 desnaturalización o adherencia a la pared del contenedor. Los estabilizadores típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihídricos (mencionados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trealosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclotoles tales como inositol, polietilenglicol; polímeros de
15 aminoácidos, agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tiocálico, 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 albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, monosacáridos, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa, disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a
20 10000 partes en peso del peso de la proteína activa.

Los tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes de humectación") pueden añadirse para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica frente a la agregación inducida por la agitación, lo que también permite que la formulación pueda exponerse a estrés de cizalla superficial sin causar la desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles plurónicos, monoéteres de polioxietilen sorbitán (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 aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

30 Los excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes de volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y codisolventes.

35 Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden administrarse individualmente, como mezclas de uno o más anticuerpos monoclonales anti-PG, mezclados o en combinación con otros agentes útiles para tratar CRC, o como adyuvantes de otra terapia para CRC. Los ejemplos de terapias de combinación y adyuvantes adecuadas se proporcionan a continuación.

40 La presente descripción comprende kits farmacéuticos que contienen anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes (incluyendo conjugados de anticuerpo) de la descripción. El kit farmacéutico es un envase que comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante (por ejemplo, bien en forma liofilizada o como una disolución acuosa) y uno o más de los siguientes:

45

- un segundo agente terapéutico, por ejemplo como se describe a continuación,
- un dispositivo para administrar el anticuerpo monoclonal anti-hPG, por ejemplo una pluma, aguja y/o jeringa; y
- agua o amortiguador de grado farmacéutico para resuspender el anticuerpo si el anticuerpo está en forma liofilizada.

50 Cada dosis unitaria del anticuerpo monoclonal anti-hPG puede estar envasada separadamente y un kit puede contener una o más dosis unitarias (por ejemplo, dos dosis unitarias, tres dosis unitarias, cuatro dosis unitarias, cinco dosis unitarias, ocho dosis unitarias, diez dosis unitarias o más). En una forma de realización específica, las unas o más dosis unitarias están contenidas cada una en una jeringa o pluma.

Dosificaciones eficaces

60 Los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes, las composiciones de los mismos, se usarán generalmente en una cantidad eficaz para conseguir el resultado pretendido, por ejemplo una cantidad eficaz para tratar CRC en un sujeto que lo necesite. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes pueden administrarse a pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) a dosificaciones terapéuticamente eficaces. Tal y como se usa en la presente memoria, una dosificación "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que confiere un beneficio terapéutico. En el contexto de la terapia de CRC, un beneficio terapéutico significa cualquier mejoría de CRC, incluyendo una cualquiera de, o combinación de, parar o retrasar la progresión de CRC (por ejemplo, de un estadio del cáncer colorrectal al siguiente), parar o retardar el empeoramiento o deterioro de los síntomas o signos de CRC, reducir la gravedad de CRC, inducir la

remisión de CRC, inhibir la proliferación de células de tumor de CRC, el tamaño del tumor de CRC o el número de tumores de CRC o reducir los niveles séricos de PG.

5 La cantidad de anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante administrada dependerá de una variedad de factores, incluyendo la naturaleza y estadio del CRC que se está tratando, la forma, ruta y sitio de administración, el régimen terapéutico (por ejemplo, si se usa un segundo agente terapéutico), la edad y el estado del sujeto particular que se está tratando, la sensibilidad del paciente que se está tratando a anticuerpos monoclonales anti-PG. La dosificación apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia. Finalmente, un médico determinará las dosificaciones apropiadas que se van a usar. Esta dosificación puede repetirse tan 10 frecuentemente como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios la cantidad y/o frecuencia de la dosificación puede alterarse o reducirse, según la práctica clínica normal. La dosificación y el régimen de tratamiento adecuados pueden establecerse monitorizando el progreso de la terapia usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia.

15 Las dosificaciones eficaces pueden estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis inicial para su utilización en animales puede formularse para conseguir una concentración circulante en sangre o suero de anticuerpo monoclonal anti-PG que está en o por encima de la afinidad de unión del anticuerpo para la progastrina como se mide *in vitro*. El cálculo de las dosificaciones para conseguir dichas concentraciones circulantes en sangre o suero teniendo en cuenta la biodisponibilidad del anticuerpo particular está dentro de las 20 capacidades de los expertos en la materia. Como guía, el lector se refiere a Fingl & Woodbury, "General Principles" en Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Capítulo 1, última edición, Pagamonon Press, y las referencias citadas en el mismo.

25 Las dosificaciones iniciales pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. Los modelos animales útiles para someter a ensayo la eficacia de los compuestos para tratar CRC son muy conocidos en la técnica. Además, en los ejemplos a continuación se describen modelos animales de CRC. Los expertos en la materia pueden adaptar rutinariamente dicha información para determinar las dosificaciones adecuadas para la administración a seres humanos.

30 La dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante de la descripción puede estar comprendida entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 75 mg/kg por administración única (por ejemplo, bolo), múltiples administraciones o administración continua o para conseguir una concentración en suero de 0,01-5000 µg/ml concentración en suero por administración única (por ejemplo, bolo), múltiples administraciones o administración continua o cualquier intervalo eficaz o valor en éste dependiendo de la afección que se está tratando, la ruta de administración y la edad, peso y estado del sujeto. En una determinada forma de realización, cada dosis puede estar comprendida entre aproximadamente 0,5 µg y aproximadamente 50 µg por kilogramo de peso corporal, por ejemplo entre aproximadamente 3 µg y aproximadamente 30 µg por kilogramo de peso corporal.

35

40

45

50

Métodos terapéuticos

55 La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes de la presente descripción para bloquear las respuestas dependientes de PG, incluyendo la proliferación celular, los hace útiles para tratar cáncer colorrectal. De acuerdo con esto, en otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para tratar CRC en un paciente que lo necesita. Generalmente, los métodos comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante de la descripción.

60 Un "sujeto" o "paciente" al que se administra un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción es preferentemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, etc.) o un primate (por ejemplo, mono o ser humano). El sujeto o paciente puede ser un ser humano, tal como un paciente adulto o un paciente pediátrico.

65 Los pacientes adecuados para la terapia con un anticuerpo monoclonal anti-hPG son pacientes diagnosticados con CRC. El CRC puede ser de cualquier tipo y estar en cualquier estadio o manifestación. Los sujetos adecuados incluyen pacientes con tumores de CRC (operables o inoperables), pacientes cuyos tumores se han

eliminado o reseccionado quirúrgicamente, pacientes con un tumor de CRC que comprende células portadoras de una mutación en un oncogén, tal como, por ejemplo, RAS o APC, pacientes que han recibido otra terapia para CRC en combinación con o adyuvante a la terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG. Otra terapia para CRC incluye, pero no está limitada a, tratamiento quimioterápico, terapia de radiación, resección quirúrgica y tratamiento con uno o más antibióticos terapéuticos adicionales, como se detalla a continuación.

5 La terapia con anticuerpo anti-hPG puede combinarse con, o ser adyuvante de, uno o más tratamientos distintos. Otros tratamientos incluyen de manera no limitativa tratamiento quimioterápico, terapia de radiación, resección quirúrgica y terapia con anticuerpo como se describe en la presente memoria.

10 La terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG puede ser adyuvante a otro tratamiento, incluyendo resección quirúrgica.

15 La terapia de combinación como se proporciona en la presente memoria implica la administración de por lo menos dos agentes a un paciente, el primero de los cuales es un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante de la descripción y el segundo de los cuales es un segundo agente terapéutico. El anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y el segundo agente terapéutico pueden administrarse simultáneamente, sucesivamente o separadamente.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y el segundo agente terapéutico se dice que se administran sucesivamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva puede ocurrir con una separación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas. Por el contrario, el anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción y el segundo agente terapéutico se dice que se administran separadamente si se administran al paciente en días diferentes, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción y el segundo agente terapéutico pueden administrarse en intervalos de 1 día, 2 días o 3 días, una semana, 2 semanas o mensualmente. En los métodos de la presente descripción, la administración del anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción pide preceder o seguir a la administración del segundo agente terapéutico.

25 30 Como ejemplo no limitativo, el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y el segundo agente terapéutico pueden administrarse simultáneamente durante un periodo de tiempo, seguido de un segundo periodo de tiempo en el que la administración del anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción y del segundo agente terapéutico se alterna.

35 35 Las terapias de combinación de la presente descripción pueden resultar en un efecto más que aditivo, o sinérgico, proporcionando beneficios terapéuticos en el que ni el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante ni el segundo agente terapéutico se administra en una cantidad que, sola, es terapéuticamente eficaz. Así, dichos agentes pueden administrarse en cantidades menores, reduciendo la posibilidad y/o gravedad de los efectos adversos.

40 40 Un segundo agente terapéutico puede ser un agente quimioterápico. Los agentes quimioterápicos incluyen de manera no limitativa moléculas radiactivas, toxinas, a las que se hace referencia asimismo como citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluyen cualquier agente que es perjudicial para la viabilidad de las células, agentes, y liposomas u otras vesículas que contienen compuestos quimioterápicos. Los ejemplos de agentes quimioterápicos adecuados incluyen de manera no limitativa 1-dehidrotestosterona, 5-fluorouracil decarbazina, 6-

45 mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleuquina, agentes alquilantes, alopurinol sodio, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC), agentes antimitóticos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), diamino dicloro platino, antraciclinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG vivo (intravesical), fosfato de betametasona sodio y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina,

50 busulfán, calcio leucourina, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), clorambucilo, cisplatino, cladribina, colchicina, estrógenos conjugados, ciclofosfamida, ciclotosfamida, citarabina, citarabina, citocalasina B, citoxán, dacarbazina, dactinomicina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunirrubicina HCL, daunorruccicina citrato, denileuquina diftitox, dextrazoxano, dibromomanitol, dihidroxi

55 antracina diona, docetaxel, dolasetrón mesilato, doxorrubicina HCL, dronabinol, L-asparaginasa de *E. coli*, emetina, epoetina- α , L-asparaginasa de Erwinia, estrógenos esterificados, estradiol, fosfato de estramustina sodio, bromuro de etidio, etinil estradiol, etidronato, factor etopósido citrororum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, gemcitabina HCL, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, gramicidina HCL, hidroxiurea, idarrubicina HCL, ifosfamida, interferón α -2b, irinotacán HCL, letrozol, leucovorina calcio, acetato de leuprolida, levamisol HCL,

60 lidocaína, lomustina, maitansinoide, mecloretamina HCL, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán HCL, mercaptipurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreótido, ondansetrona HCL, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato disodio, pentostatina, pilocarpina HCL, plimicina, polifeprosán 20 con implante de carmustina, porfimer sodio, procaína,

65 procarbazina HCL, propranolol, rituximab, sargamostim, estreptozotocina, tamoxifeno, taxol, tegafur, tenipósido, tenopósido, testolactona, tetracaína, tioepa clorambucilo, tioguanina, tiotepa, topotecán HCL, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina

Los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes descritos en la presente memoria pueden administrarse a un paciente que necesita tratamiento para cáncer colorrectal recibiendo una combinación de agentes quimioterápicos. Las combinaciones ejemplificativas de agentes quimioterápicos incluyen 5-fluorouracilo (5FU) en combinación con leucovorina (ácido folínico o LV); capecitabina, en combinación con uracilo (UFT) y leucovorina; tegafur en combinación con uracilo (UFT) y leucovorina; oxaliplatino en combinación con 5FU, o en combinación con capecitabina; irinotacán en combinación con capecitabina, mitomicina C en combinación con 5FU, irinotacán o capecitabina. El uso de otras combinaciones de agentes quimioterápicos descritos en la presente memoria también es posible.

Como se conoce en la técnica relevante, los regímenes de quimioterapia para cáncer colorrectal que usan combinaciones de diferentes agentes quimioterápicos se han estandarizado en ensayos clínicos. Dichos regímenes se conocen frecuentemente por acrónimos e incluyen 5FU Mayo, 5FU Roswell Park, LVFU2, FOLFOX, FOLFOX4, FOLFOX6, bFOL, FUFOX, FOLFIRI, IFL, XELOX, CAPOX, XELIRI, CAPIRI, FOLFOXIRI. Véanse, por ejemplo, Chau, I., *et al.*, 2009, Br. J. Cancer 100: 1704-19 y Field, K., *et al.*, 2007, World J. Gastroenterol. 13: 3806-15.

Los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes también pueden combinarse con otros anticuerpos terapéuticos. De acuerdo con esto, la terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG puede combinarse con, o administrarse como adyuvante con un anticuerpo monoclonal diferente tal como, a título de ejemplo no limitativo un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (receptor de EGF) o un anticuerpo monoclonal anti-VEGF. Los ejemplos específicos de anticuerpos anti-EGFR incluyen cetuximab y panitumumab. Un ejemplo específico de un anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

25 Detección de progastrina usando anticuerpos anti-hPG

Los anticuerpos monoclonales anti-PG, ya sean neutralizantes o no neutralizantes, también son útiles para aplicaciones que dependen de la detección de la PG tales como diagnóstico de CRC o monitorización del tratamiento en el CRC de un sujeto. De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar cáncer colorrectal en un paciente, que comprende determinar la cantidad de progastrina en una muestra del paciente usando un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la presente descripción. Generalmente, los métodos para diagnosticar cáncer colorrectal en un paciente comprenden medir la progastrina en una muestra obtenida de un paciente usando los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción, en el que la medida de 20 pM a 400 pM de progastrina en la muestra es indicativa de cáncer colorrectal. La progastrina puede medirse en muestras, por ejemplo, de sangre, suero, plasma, tejido y/o células. La detección de hPG puede realizarse usando ensayos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria, tales como, ELISA, ELISA sándwich, inmunotransferencia (transferencia Western), inmunoprecipitación, tecnología BIACORE y similares.

Como se indica en la presente memoria, la progastrina no es sino uno de varios polipéptidos diferentes que resultan del procesamiento posterior a la traducción del producto del gen de la gastrina. El diagnóstico, la monitorización y otros métodos descritos en la presente memoria detectan específicamente hPG a diferencia de otros productos del gen de la gastrina, incluyendo productos de degradación. De acuerdo con esto, en unas formas de realización específicas, hPG se detecta usando un ELISA como se describe en la presente memoria, en el que se usan dos anticuerpos frente a hPG, dirigidos al extremo N y C terminal de hPG respectivamente. En algunas formas de realización, uno de los dos anticuerpos usados para la detección es un anticuerpo monoclonal anti-hPG como se describe en la presente memoria. Los niveles de hPG comprendidos entre 20 pM y 400 pM son indicativos de cáncer colorrectal.

En general, el procedimiento para determinar los niveles de hPG usando los anticuerpos monoclonales anti-hPG es como se expone a continuación. 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", frente a hPG. El anticuerpo de captura puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-hPG que se une al extremo C o N terminal de hPG. Después de bloquear, se aplica una muestra de ensayo a la superficie seguido de un periodo de incubación. La superficie se lava para eliminar el antígeno no unido y se aplica una disolución que contiene un segundo anticuerpo, "de detección", frente a hPG. El anticuerpo de detección puede ser cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria, siempre que el anticuerpo de detección se une a un epítopo diferente que el del anticuerpo de captura. Por ejemplo, si el anticuerpo de captura se une a una región peptídica C-terminal de hPG, un anticuerpo de detección adecuado será uno que se une a una región peptídica N-terminal de hPG. Los niveles de progastrina pueden detectarse bien directamente (si, por ejemplo, el anticuerpo de detección está conjugado con un marcaje detectable) o indirectamente (mediante un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo de detección anti-hPG).

En una forma de realización específica, los niveles de hPG se miden como se expone a continuación en una muestra de ensayo. Se recubren placas de 96 pocillos con entre 0,5 y 10 µg/ml de un anticuerpo políclonal anti-hPG C-terminal de conejo y se incuba toda la noche. Las placas se lavan tres veces en PBS-Tween (0,05%) y se bloquean con 2% (p/v) de leche seca desnatada en PBS-Tween (0,05%). Separadamente, las muestras de

ensayo, muestras control (blanco o muestras de plasma o suero negativas para PG), y entre aproximadamente 5 pM ($0,5 \times 10^{-11}$ M) y aproximadamente 0,1 nM (1×10^{-10} M) de un estándar de referencia de hPG (hPG liofilizada diluida en plasma o suero negativo para PG) se preparan en un diluyente apropiado (por ejemplo, PBS-Tween 0,05%). Las muestras se incuban en las placas recubiertas durante entre 2 y 4 horas a 37°C, o alternativamente

5 entre 12 y 16 horas a 21°C. Después de la incubación, las placas se lavan tres veces con PBS-Tween (0,05%) y se incuban con entre 0,001 y 0,1 µg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal como se describe en la presente memoria, acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Nakane *et al.*, 1974, *J. Histochem. Cytochem.* 22(12): 1084-1091) durante 30 minutos a 21°C. Las placas se lavan tres veces en PBS-Tween (0,05%) y se añade el sustrato de HRP durante 15 minutos a 21°C. La reacción se interrumpe añadiendo 100 µl de 0,5M ácido sulfúrico y se toma una medida de densidad óptica a 405 nm. Los niveles de hPG de la muestra de ensayo se determinan por comparación con una curva estándar construida a partir de las medidas derivadas del estándar de referencia de hPG.

10 Típicamente, los pacientes se diagnostican tomando como base procedimientos invasivos tales como evaluación histológica de tejido de biopsia así como otros procedimientos invasivos tales como colonoscopia. El CRC se divide en 5 estadios desglosados en estadio 0 (cáncer limitado al recubrimiento más interno del colon o recto), estadio 1 (cáncer en la pared interna del colon o recto), estadio 2 (cáncer extendido a través de la pared del colon pero no encontrado en los ganglios linfáticos adyacentes), estadio 3 (cáncer encontrado en los ganglios linfáticos y tejido que rodea al colon o recto), y estadio 4 (el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo).

15 20 Desde una perspectiva histológica, los tumores colorrectales presentan un amplio espectro de neoplasias, comprendidos entre crecimientos benignos y cáncer invasivo y son predominantemente tumores derivados del epitelio (es decir, adenomas o adenocarcinomas). Las lesiones pueden clasificarse en tres grupos: pólipos no neoplásicos, pólipos neoplásicos (pólipos adenomatosos, adenomas), y cánceres. Los pólipos adenomatosos son tumores benignos que pueden sufrir transformación maligna y se han clasificado en tres tipos histológicos,

25 25 con potencial maligno creciente: tubular, tubuloveloso y veloso. Los adenocarcinomas también se han categorizado según su histología en adenocarcinoma mucinoso (coloide); adenocarcinoma en anillo de sella; tumores escirro; y neuroendocrino.

30 35 A diferencia de los medios actuales para diagnosticar CRC, la presente descripción proporciona métodos para diagnosticar a sujetos con CRC en ausencia de análisis histológico o estadio de la enfermedad, tomando como base la medida de los niveles de hPG que pueden determinarse a partir de una muestra de sangre. Además, los métodos de la presente descripción son útiles para seleccionar pacientes con CRC adecuados para terapia monoclonal anti-hPG independientemente de cómo se ha diagnosticado a un paciente.

40 45 Los niveles séricos de PG también son útiles para evaluar la eficacia del tratamiento de CRC. De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona un método para monitorizar la eficacia de la terapia de cáncer colorrectal que comprende determinar los niveles de PG en un paciente que se está tratando para CRC. Los métodos para monitorizar la eficacia de la terapia de cáncer colorrectal comprenden determinar repetidamente los niveles de hPG usando un anticuerpo monoclonal anti-PG de la presente descripción en un paciente con cáncer colorrectal que se está sometiendo a tratamiento para cáncer colorrectal, en el que una disminución en los niveles circulantes de hPG del paciente durante un intervalo de tratamiento es indicativa de la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, puede tomarse una primera medida de los niveles circulantes de hPG de un paciente seguido de una segunda medida mientras o después de que el paciente recibe tratamiento para cáncer colorrectal. Las dos medidas se comparan y una disminución en los niveles de hPG es indicativa de beneficio terapéutico.

50 55 En un aspecto, la divulgación proporciona kits de diagnóstico que contienen los anticuerpos monoclonales anti-hPG (incluyendo conjugados de anticuerpo). El kit de diagnóstico es un envase que comprende por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción (por ejemplo, bien en forma liofilizada o como una disolución acuosa) y uno o más reactivos útiles para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico (por ejemplo, diluyentes, un anticuerpo marcado que se une a un anticuerpo monoclonal anti-hPG, un sustrato apropiado para el anticuerpo marcado, hPG en una forma apropiada para usarse como un control positivo y estándar de referencia, un control negativo). En unas formas de realización específicas, un kit comprende dos anticuerpos anti-hPG, en el que por lo menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal anti-hPG. Opcionalmente, el segundo anticuerpo es un anticuerpo polyclonal anti-hPG. En algunas formas de realización, el kit de la presente descripción comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal como se describe en la presente memoria.

60 65 Los anticuerpos anti-hPG pueden estar marcados, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, el kit puede incluir un anticuerpo marcado que se une a un anticuerpo monoclonal anti-hPG y se conjuga con una enzima. Cuando el anticuerpo monoclonal anti-hPG u otro anticuerpo se conjuga con una enzima para detección, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos, tales como estabilizadores, amortiguadores (por ejemplo, un amortiguador de bloqueo o amortiguador de lisis) y semejantes. Los anticuerpos monoclonales anti-hPG incluidos en un kit de diagnóstico pueden inmovilizarse en una superficie sólida o, alternativamente, una superficie sólida (por ejemplo, un portaobjetos) en la que puede inmovilizarse el anticuerpo se incluye en el kit. Las cantidades relativas de los diferentes reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad

del ensayo. Los anticuerpos y los demás reactivos pueden proporcionarse (individualmente o combinados) como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que, en disolución, proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

5 Los kits pueden incluir materiales de instrucción que contienen instrucciones (por ejemplo, protocolos) para la práctica de los métodos de diagnóstico. Aunque los materiales de instrucción comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no están limitados a los mismos. La presente invención comprende un medio apto para almacenar dichas instrucciones y comunicarlas al usuario final. Dichos medios incluyen de manera no limitativa medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan dichos materiales de instrucción.

10

6. Ejemplos

15 Los ejemplos siguientes son ilustrativos y no limitativos.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales frente a progastrina

Inmunógenos para progastrina humana

20 Se generaron varios inmunógenos para desarrollar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales frente a la progastrina humana. Los antígenos usados previamente para generar anticuerpos policlonales, tales como progastrina humana de longitud completa e inmunógenos basados en los residuos 70 a 80 de hPG, no dieron lugar a una respuesta inmunitaria monoclonal ni dieron lugar a anticuerpos monoclonales específicos de PG.

25 Como se describe con mayor detalle a continuación, los antígenos de 14 aminoácidos y más largos, que incluían secuencias únicas de hPG en el extremo N-terminal y C-terminal de la proteína, fueron aptos para inducir una respuesta inmunitaria adecuada en animales y se usaron para generar hibridomas que producen más de 20 anticuerpos monoclonales diferentes frente a hPG. Sorprendentemente, varios inmunógenos que incluían los residuos 55 a 80 de hPG, algunos de los cuales también se encuentran en otros péptidos derivados del gen de la gastrina, se usaron con éxito para generar anticuerpos monoclonales que eran específicos para hPG. La tabla siguiente resume los inmunógenos ensayados.

30

Tabla 2

Experimento	Inmunógeno	nº de clones positivos
1	Progastrina humana (SEC ID nº: 20)	0*
1	(SEC ID nº: 26)-Ahx-Cys-BSA	2
2	(SEC ID nº: 26)-Ahx-Cys-KLH	2
3	(SEC ID nº: 26)-Ahx-Cys-KLH	8
1	BSA-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 97)	0
2	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 97)	0
3	KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 96)	10
	DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 96)	3

* Los ratones inmunizados no presentaron ninguna respuesta inmunitaria.

35 Los inmunógenos presentados en la tabla 2 se prepararon según las técnicas conocidas en la técnica, usando síntesis química de la secuencia peptídica y el conector, seguido de entrecruzamiento con el vehículo albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa (KLH), o toxina de la difteria (DT) usando un agente de entrecruzamiento apropiado (por ejemplo, MBS (éster de m-Maleimidobenzoil-N-hidrosuccinimida), 40 glutaraldehído o Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato). (Coligan JE *et al.*, Current protocols in Immunology, Vol. 2, Nueva York: John Wiley and Sons; 1996, p 9.0, 1-9.0.15; Harlow DL. Antibodies: A Laboratory Manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998, p72-87). Los conectores usados fueron uno o dos residuos de ácido aminohexanoico (Ahx) acoplados a un residuo de cisteína.

45 En cada uno de tres experimentos, se inyectaron a los ratones Balb/c 4 a 5 veces inmunógenos N-terminales, y 2 a 4 veces inmunógenos C-terminales. Cada inyección administró 10 µg del inmunógeno con Ribi, Alun o de adyuvante de Freund.

Fusiones celulares y cribado de hibridomas

50 El suero de cada ratón se ensayó por ELISA frente al inmunógeno y se recogieron los esplenocitos de los ratones con la respuesta inmunitaria más fuerte. Los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma Sp2 usando polietilenglicol y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 15000 a 35000 células por pocillo. Las células fusionadas se seleccionaron, usando un medio que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT).

55

Los sobrenadantes de los hibridomas se cribaron por ELISA respecto a la capacidad de unirse al inmunógeno y a la progastrina de longitud completa. Se realizaron tres ciclos de cribado para asegurar que únicamente se seleccionaron los hibridomas que producen de manera estable anticuerpos que reconocen hPG de longitud completa y el inmunógeno.

5 El cribado de los hibridomas y anticuerpos monoclonales para determinar la unión a diferentes péptidos PG se realizó usando una técnica ELISA como se describe a continuación. Este protocolo se usó para cribar para unión a PG de los esplenocitos fusionados, subclones del primer y segundo ciclo, así como para verificar la especificidad de los anticuerpos frente a PG, comparado con otros péptidos derivados del gen de la gastrina.

10 Brevemente, se incubaron placas de 96 pocillos toda la noche a 4°C con la concentración o concentraciones apropiadas de un péptido de ensayo en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), después de lo cual los pocillos se lavaron tres veces con disolución de lavado (PBS y 0,1% Tween-20), y se incubaron durante 2 horas a 22°C con 100 µl de disolución de bloqueo (PBS, 0,1% Tween-20, 0,1% albúmina de suero bovino o hidrolizado de caseína) por pocillo. Después del bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces y se añadió el anticuerpo primario - el anticuerpo que se va a ensayar-. Para el cribado inicial de los esplenocitos fusionados, se añadieron 50 µl del sobrenadante de cultivo de cada cultivo que se va a ensayar a cada pocillo de la placa. En los ensayos realizados en anticuerpos monoclonales, se añadieron 100 µl del anticuerpo de ensayo en PBS y 0,1% Tween-20 a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 22°C, después de lo cual la disolución de anticuerpo primario se desechó y se reemplazó, después de una etapa de lavado (3X 100 µl de disolución de lavado, como se ha indicado anteriormente), por disolución de bloqueo que contiene el anticuerpo secundario, que se une al anticuerpo primario y está acoplado a una enzima. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo IgG (Fc) antirratón de cabra acoplado a peroxidasa de rábano. Después de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario, se añadieron 100 µl de disolución de sustrato (por ejemplo, Fast OPD, o dihidrocloruro de O-

15 Fenilendiamina, disponible en Sigma-Aldrich Co., preparado según las direcciones del fabricante) a cada pocillo y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a 22°C. La reacción se interrumpió añadiendo 50 µl de 4N ácido sulfúrico y se determinó la cantidad de sustrato catalizado midiendo la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. La conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario (de ensayo) unido al antígeno. Los experimentos se hicieron en duplicado y las medidas de DO se representaron como una función de la concentración de antígeno o anticuerpo dependiendo del objetivo del experimento. Las muestras se clasificaron como positivas para anticuerpos anti-PG si la D.O. medida estaba entre 0,2 y 1,5. El mismo intervalo de D.O. se usó para identificar los anticuerpos que se unieron al péptido inmunógeno usado para inocular a los animales de ensayo.

20

25

30

35 Los materiales y reactivos ejemplificativos usados en el ensayo son los siguientes:

Producto	Fuente	Referencia
Placas de 96 pocillos Greiner Microlon	Dutscher	# 655092
10X DPBS	Dutscher	# P04-53500
Tween-20	Sigma	# 63158
BSA (para bloqueo)	Euromedex	# 04-100-810-C
Caseína hidrolizada (cuando se usa en lugar de BSA)	Sigma	22090
Sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos monoclonales N-terminales o C-terminales	BioRéalités	Como se describen en la presente memoria
IgG (Fc) antirratón de cabra, acoplada con peroxidasa	Thermo	# 31439
Fast OPD	Sigma	# P9187
95-97% Ácido Sulfúrico	Sigma	# 30743

Los péptidos ejemplificativos usados en el cribado de hibridomas y anticuerpos monoclonales fueron los siguientes:

Péptidos de cribado	Fuente	Referencia
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
Progastrina humana recombinante	BioRéalités	McQueen <i>et al.</i> , 2002, J. Protein Chem., 21(7): 465-471.
Gastrina humana I (G-17)	Sigma	# 53673
Gastrina extendida con glicina 17 (G-Gly)	Auspep	# S10082
KLH	Pierce (Perbio)	# 77653
Péptido flanqueante C-terminal (CTFP)	Auspep	# R41345

La progastrina humana recombinante se produjo como se describe en McQueen *et al.*, 2002, J. Protein Chem. 21: 465-471) con pequeñas modificaciones. Brevemente, células bacterianas BL21 DE3 Star (InVitrogen) se transformaron con un vector que contiene la secuencia de la progastrina humana de longitud completa en un núcleo PGEX-GST-TEV (GE Healthcare). Las bacterias se hicieron crecer en medio LB que contiene 0,5 mM IPTG durante 3 horas a 37°C. Los sedimentos bacterianos se rompieron usando una Prensa French, y las

fracciones tanto solubles como no solubles se separaron por centrifugación. Posteriormente, se aisló hPG etiquetada con GST usando una columna de afinidad de glutatión y PG se escindió de GST con la proteasa del virus del mosaico del tabaco Nla (TEV). Finalmente, PG se dializó frente al amortiguador final (10mM Hepes, 0,5 % BSA, pH 7,4).

5 Los hibridomas se clonaron en primer lugar, después se subclonaron y se amplificaron. Los hibridomas positivos se seleccionaron tomando como base los criterios siguientes: (1) especificidad de PG e inmunógeno, (2) afinidad relativa de los anticuerpos, (3) crecimiento de las células del hibridoma, (4) secreción de anticuerpos, y (5) monoclonalidad de los hibridomas. Los ensayos y los criterios de selección fueron como se expone a continuación.

10 Para especificidad, los sobrenadantes de los hibridomas de ensayo se ensayaron por ELISA como se ha descrito anteriormente (50 µl de una dilución 1 en 2 del sobrenadante en el medio de ensayo PBS). Los hibridomas se clasificaron como positivos si la medida de D.O. estaba entre 0,2 y 1,5 en un ensayo con hPG o el inmunógeno usado para inocular los ratones de ensayo. Como criterio adicional para la especificidad, los clones se seleccionaron tomando como base la ausencia de unión a otros péptidos derivados del gen de la gastrina. La ausencia de unión se midió como una diferencia no estadísticamente significativamente diferente entre la señal de los pocillos de ensayo y la señal media de los pocillos control que contienen sólo PBS.

15 20 Para la caracterización de la afinidad, se ensayaron diluciones seriadas de los anticuerpos por ELISA para unión a hPG, como se ha descrito anteriormente. Las diluciones estándar usadas en los ensayos de los anticuerpos N-terminales fueron 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 ng/ml. Las diluciones estándar usadas en ensayos de anticuerpos C-terminales fueron 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 ng/ml.

25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 105

En un segundo experimento, los ratones se inocularon con un péptido N-terminal unido a KLH. Se realizaron dos fusiones con células de mieloma Sp2. De éstas, sólo una fusión generó clones positivos para PG e inmunógeno, que también fueron específicos para PG. De ésta, se sembraron 1920 hibridomas. Muchos hibridomas fueron positivos en el ensayo con los péptidos inmunizantes pero no progastrina, o no fueron específicos para PG.

5 Específicamente, 297 hibridomas mostraron una señal positiva fuerte para el péptido inmunizante (aproximadamente 15,5% de 1920), de los cuales 124 también fueron positivos para unión a progastrina (6,5%). Hubo 36 hibridomas, o 1,8%, que fueron positivos para progastrina pero no el inmunógeno usado. Sólo 12 hibridomas de los 1920 sembrados proporcionaron anticuerpos que se unen específicamente a progastrina pero no a otros productos del gen de la gastrina (0,6% del total de hibridomas, 3,6% de los clones que fueron positivos para el péptido y/o progastrina en el primer cribado). De los 12 clones seleccionados, sólo 2 fueron lo suficientemente estables como para establecerse como clones permanentes y congelarse durante un almacenamiento a largo plazo. Así, en este segundo experimento, de los casi 2000 hibridomas que se sembraron, únicamente se recuperaron 2 clones, 6B5B11C10 (que produce anti-hPG MAb 3) y 20D2C3G2 (que produce anti-hPG MAb4), que producen anti-hPG MAb3 y MAb4 respectivamente, que expresan anticuerpos monoclonales aptos para unirse a hPG y al péptido inmunizante y que tienen especificidad para la progastrina sobre otros productos del gen de la gastrina y alta afinidad para hPG. Ambos anticuerpos ejemplificativos son del isótipo IgG1.

10 En un tercer experimento, los ratones se inocularon con el mismo inmunógeno que en el segundo experimento. Las fusiones con células de mieloma Sp2 se realizaron con esplenocitos de dos ratones con la respuesta inmunitaria más fuerte. Los hibridomas se sembraron a partir de las fusiones (3840 hibridomas de una fusión cada uno, por ratón) y los sobrenadantes se sometieron a ensayo para unión a PG e inmunógeno, así como especificidad para PG. De cada fusión, 6 hibridomas mostraron especificidad para PG, de los cuales se seleccionaron 3 subclones que cumplían la selección adicional para crecimiento, monoclonalidad, secreción de 15 anticuerpos, afinidad relativa. Así, en total, 2,9% de los hibridomas ensayados después de sembrar (220/7680) fueron positivos para PG e inmunógeno, de los cuales 0,15% fueron clones positivos (12/7680), constituyendo los subclones finales recuperados 0,15% de los hibridomas originales sembrados (6/7680). Este experimento generó los hibridomas 1E9A4A4 (que producen anti-hPG MAb 15), 1E9D9B6 (que producen anti-hPG MAb 16), 1C8D10F5 (que producen anti-hPG MAb 17), 1A7C3F11 (que producen anti-hPG MAb 18), 1B3B4F11 (que producen anti-hPG MAb 19), y 1C11F5E8 (que producen anti-hPG MAb 20).

20 La tabla siguiente representa el número de clones sembrados para cada experimento, el inmunógeno usado y el número y porcentaje de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que reconocieron tanto el inmunógeno como la progastrina de longitud completa.

25

Expt	Inmunógeno	Clones sembrados	Sobrenadantes de hibridoma PG ⁺	Clones específicos de PG	Subclones específicos para PG, que producen IgG
1	(SEC ID nº: 26)-Ahx-Cys-BSA	2304	17 (0,74%)	9 (0,39%)	2 (0,087%)
2	(SEC ID nº: 26)-Ahx-Cys-KLH	1920	124 (6,5%)	12 (0,6%)	2 (0,1%)
3	(SEC ID nº: 26)-Ahx-Cys-KLH	7680	220 (2,9%)	12 (0,15%)	6 (0,1%)

35 Anticuerpos monoclonales C-terminales frente a progastrina

40 Se generaron anticuerpos monoclonales C-terminales frente a un antígeno que contiene los residuos 55 a 80 de hPG unidos bien a KLH o a DT mediante un conector Cys-Ahx-Ahx en el extremo N-terminal del antígeno de 26 residuos (Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEAYGWMDFGRSAEDEN (SEC ID nº: 96)). Los intentos de generar hibridomas con un antígeno más pequeño que únicamente contiene los residuos 70 a 80 de hPG, Cys-Ahx-Ahx-FGRRSAEDEN (SEC ID nº: 97), conjugado bien con BSA o KLH, fracasaron en la generación de clones.

45 Se realizaron tres experimentos. En los dos primeros experimentos, en los que se usó el péptido más corto, se recuperaron cero subclones. Específicamente, en un primer experimento se inyectó a 4 ratones un péptido C-terminal correspondiente a SEC ID nº: 97, unido a BSA. Ninguna de las fusiones generó ningún hibridoma que produzca IgG. En un segundo experimento, se inyectó a 6 ratones, 3 a cada uno, un péptido correspondiente a SEC ID nº: 97, unido a KLH en su extremo N-terminal, o un péptido correspondiente a SEC ID nº: 97, unido a KLH en su extremo C-terminal. Para el primer inmunógeno, se realizaron fusiones y se recuperaron los hibridomas, pero no se aislaron subclones positivos para unión a PG y especificidad para PG. Para el segundo inmunógeno, ninguno de los ratones desarrolló una respuesta inmunitaria y no se realizaron fusiones.

50 55 En un tercer experimento, se usó un péptido de 26 aminoácidos que incluye las secuencias C-terminales no únicas de hPG. El inmunógeno, que incluía un péptido correspondiente a SEC ID nº: 96 unido a KLH o DT, se

inyectó a los ratones. Las fusiones con células de mieloma Sp2 se realizaron con esplenocitos de los dos ratones que tuvieron la respuesta más fuerte. Se sembraron 3840 híbridos a partir de una fusión por ratón. Globalmente, de los 7680 híbridos cribados, de los cuales 382 (5%) fueron positivos para PG y específicos para PG, se recuperaron 13 (0,17%) subclones estables, positivos: 1B4A11D11 (que produce anti-hPG MAb 5),

5 1B6A11F2 (que produce anti-hPG MAb 6), 1B11E4B11 (que produce anti-hPG MAb 7), 1C10D3B9 (que produce anti-hPG MAb 8), D8F5B3 (que produce anti-hPG MAb 9), 1E1C7B4 (que produce anti-hPG MAb 10), 2B4C8C8 (que produce anti-hPG MAb 11), 2B11E6G4 (que produce anti-hPG MAb 12), 2C6C3C7 (que produce anti-hPG MAb 13), 2H9F4B7 (que produce anti-hPG MAb 14), 1F11F5E10 (que produce anti-hPG MAb 21), 1F11F5G9 (que produce anti-hPG MAb 22), y 1A11F2C9 (que produce anti-hPG MAb 23).

10 La tabla siguiente muestra el número de clones sembrados para cada experimento, el inmunógeno usado, el número de híbridos cribados, el número y porcentaje de híbridos que producen anticuerpos monoclonales que se unen a PG y el inmunógeno, que son específicos para PG y que cumplen los criterios de selección (crecimiento, monoclonalidad, afinidad relativa, etc.) después de tres ciclos de subclonación.

15 Tabla 4

Expt	Inmunógeno	Clones sembrados	Sobrenadantes de híbrido PG ⁺	Clones específicos para PG	Subclones específicos para PG, que producen IgG
1	BSA-conector-(SEC ID nº: 97)	3072	10 (0,32%)	9 (0,29%)	0
2	KLH- conector-(SEC ID nº: 97) (SEC ID nº: 97)-conector-KLH	1920	27 (0,47%) 0	4 (0,07%) 0	0
3	KLH-conector-(SEC ID nº: 96) DT-conector-(SEC ID nº: 96)	3840	192 (5%) 190 (4,95%)	17 (0,44%) 13 (0,34%)	10 (0,26%) 3 (0,08%)

20 Los anticuerpos monoclonales y los híbridos estables a partir de los que se producen se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 5

Anticuerpo monoclonal	Híbrido	Ig de Ratón
MAb 1	43B9G11	IgG1
MAb 2	WE5H2G7	IgG1
MAb 3	6B5B11C10	IgG1
MAb 4	20D2C3G2	IgG1
MAb 5	1B4A11D11	IgG1
MAb 6	1B6A11F2	IgG1
MAb 7	1B11E4B11	IgG1
MAb 8	1C10D3B9	IgG1
MAb 9	1D8F5B3	IgG1
MAb 10	1E1C7B4	IgG1
MAb 11	2B4C8C8	IgG1
MAb 12	2B11E6G4	IgG1
MAb 13	2C6C3C7	IgG1
MAb 14	2H9F4B7	IgG1
MAb 15	1E9A4A4	IgG1
MAb 16	1E9D9B6	IgG1
MAb 17	1C8D10F5	N.D.
MAb 18	1A7C3F11	IgG2
MAb 19	1B3B4F11	IgG2
MAb 20	1C11F5E8	IgG2
MAb 21	1F11F5E10	IgG2
MAb 22	1F11F5G9	IgG2
MAb 23	1A11F2C9	IgG2

25 Las estirpes celulares de híbrido 1B4A11D11 (MAb 5, no. de registro CNCM I-4371), 1B6A11F2 (MAb 6, no. de registro CNCM I-4372), 1B11E4B11 (MAb 7, no. de registro CNCM I-4373), 2B4C8C8 (MAb 11, no. de registro CNCM I-4374), 2B11E6G4 (MAb 12, no. de registro CNCM I-4375), y 1E9A4A4 (MAb 15, no. de registro y NCM I-4376) se depositaron según el Tratado de Budapest y se recibieron el 6 de octubre, 2010 por la

Collection Nationale de Cultures de Microorganisms (CNCM), Instituto Pasteur, París, Francia.

Clonación y secuenciación de los anticuerpos monoclonales anti-hPG

5 Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas pueden clonarse y secuenciarse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Los anticuerpos monoclonales de los hibridomas presentados en la Tabla 5 anterior se secuenciaron como se describe a continuación.

10 Las secuencias que codifican los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 6B5B11C10 y 20D2C3G2 se clonaron y secuenciaron usando técnicas estándares. Brevemente, se aisló el ARN total a partir de sedimentos celulares congelados usando reactivos RNABee, AMSBio no. de catálogo CS-104B, usado según las instrucciones del fabricante. El ADNc para las regiones V se preparó a partir de ARNm usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), seguido de una amplificación rápida 5' de los extremos del ADNc (RACE). La síntesis de ADNc se realizó usando cebadores específicos de la región 15 constante, después de lo cual el producto de la primera cadena se purificó y se usó desoxinucleótido transferasa terminal para añadir colas homopoliméricas a los extremos 3' del ADNc. Las secuencias de ADNc "con cola" se amplificaron por PCR usando parejas de cebadores, cada uno de los cebadores para la cola homopolimérica y bien la región V_H o V_L , respectivamente. Los productos de PCR de la región variable de cadena pesada y ligera se clonaron en un vector de clonación "TA" (p-GEM-T easy, Promega no. de cat. A 1360) y se secuenciaron 20 usando procedimientos estándar. Ver la figura 2A-B (MAb 3), figura 2C-D (MAb 4).

25 Las secuencias que codifican los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 1C10D3B9, 2C6C3C7, 1B3B4F1, y 1E9D9B61 se determinaron como se expone a continuación. Se aisló el ARN total de los sedimentos celulares congelados usando el kit RNAqueous®-4PCR (Ambion no. de cat. AM1914) usado según las instrucciones del fabricante. El ARNm de la región V de la cadena pesada se amplificó usando un conjunto de 30 seis grupos de cebadores degenerados (HA a HF) y el ARNm de la región V de la cadena ligera se amplificó usando un conjunto de ocho grupos de cebadores degenerados, siete para el grupo κ (KA a KG) y uno para el grupo λ (LA). El ADNc para las regiones variables se preparó a partir de ARNm usando RT-PCR. La síntesis de ADNc se realizó usando cebadores específicos para la región constante, seguido de PCR usando grupos de 35 cebadores degenerados para las secuencias señal murinas 5' y cebadores para las regiones constantes 3' para cada una de IgGVH, IgkVL e Ig λ VL. (Jones *et al.*, 1991, Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions, Bio/Technology 9: 88-89). Los productos de PCR de la región variable de la cadena pesada y ligera se clonaron en un vector de clonación "TA" (p-GEM-T easy, Promega no. de cat. A 1360) y se secuenciaron usando procedimientos estándar. Ver las figuras 2E-F (MAb 8), 2G-H (MAb 13), 2I-J (MAb 16), y 2K-L (MAb 19).

Ejemplo 2: Afinidad de unión de los anticuerpos anti-hPG

A. Afinidad Relativa

40 La afinidad relativa de los anticuerpos monoclonales ejemplificativos se midió usando el método ELISA descrito anteriormente, en el que los pocos se recubrieron con una disolución de péptido que contiene 50ng de progastrina y se incubó en presencia de concentraciones crecientes de cada anticuerpo monoclonal como se expone a continuación:

Anticuerpo monoclonal	Intervalo de concentración ensayado
Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales MAbs 1-4	0,001-1 μ g/ml
Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales MAbs 3, 15-20	0,1-100 ng/ml
Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales MAbs 5-14, 21-23	0,03-30 ng/ml

50 La figura 3A muestra la afinidad relativa de cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG, MAbs 1-4 ensayados a concentraciones de 1 ng/ml a 1 μ g/ml. La figura 3B muestra la afinidad relativa de los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales MAbs 3 y 15-20 ensayado a concentraciones de anticuerpo de 0,1-100 ng/ml. La figura 3C muestra la afinidad relativa de los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales MAbs 5-14 y 21-23 ensayado a concentraciones de anticuerpo de 0,03-30 ng/ml.

B. Medidas de la constante de afinidad

55 Para proporcionar una cuantificación más absoluta de la afinidad para los anticuerpos monoclonales, las constantes de afinidad se midieron usando la técnica Proteon (BioRad), según Nahshol *et al.*, 2008, Analytical Biochemistry 383: 52-60. Brevemente, un anticuerpo IgG anti-ratón (50 μ g/ml) se utilizó para recubrir un chip sensor en primer lugar, asegurando que la señal detectada por el chip después de la inyección del anticuerpo está entre 10000 y 11500 RU (unidades de respuesta). El anticuerpo monoclonal murino que se va a ensayar se inyectó (concentraciones típicas: 30 μ g/ml). La unión suficiente del anticuerpo que se va a ensayar se determinó tomando como base una señal adicional de por lo menos 500 RU en el chip sensor. Se midió un curso de tiempo de la interacción entre los anticuerpos monoclonales antiprogastrina y la progastrina inyectando varias concentraciones de progastrina, por ejemplo 200, 100, 50, 25, y 12,5 nM, y se detectó el nivel de asociación.

Típicamente, están disponibles varios canales para ensayar múltiples anticuerpos en paralelo en un único experimento, haciendo posible ensayar la unión de los anticuerpos de ensayo a varias concentraciones de PG en paralelo. Típicamente, un canal se reserva para un anticuerpo monoclonal murino que no es específico para PG, como un control para unión no específica, y en otro canal se inyecta amortiguador de dilución solo como una línea base para la señal de fondo. Generalmente, no es detectable ninguna unión en los canales en los que se ha inyectado anticuerpo murino no específico. Los anticuerpos que presentan un alto nivel de asociación en este entorno, que puede resultar en la saturación del anticuerpo monoclonal atrapado por progastrina, pueden ensayarse frente a concentraciones menores de progastrina (50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 nM), lo que permite una medida más refinada.

5 Típicamente, están disponibles varios canales para ensayar múltiples anticuerpos en paralelo en un único experimento, haciendo posible ensayar la unión de los anticuerpos de ensayo a varias concentraciones de PG en paralelo. Típicamente, un canal se reserva para un anticuerpo monoclonal murino que no es específico para PG, como un control para unión no específica, y en otro canal se inyecta amortiguador de dilución solo como una línea base para la señal de fondo. Generalmente, no es detectable ninguna unión en los canales en los que se ha inyectado anticuerpo murino no específico. Los anticuerpos que presentan un alto nivel de asociación en este entorno, que puede resultar en la saturación del anticuerpo monoclonal atrapado por progastrina, pueden ensayarse frente a concentraciones menores de progastrina (50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 nM), lo que permite una medida más refinada.

10 Las constantes de afinidad (KD) se calcularon como la relación entre la constante de disociación (kd) y la constante de asociación (ka). Los valores experimentales se validaron analizando la similitud estadísticamente relevante entre las curvas experimentales tomando como base las medidas de unión y los perfiles teóricos. El modelo matemático usado en los experimentos Proteon para seleccionar si las curvas experimentales se ajustan al modelo teórico fue el modelo de Langmuir, basado en una interacción 1: 1 entre las moléculas de progastrina y los anticuerpos monoclonales antiprogastrina.

15

Tabla 6

Anticuerpo monoclonal	Constante de afinidad medida KD (M)
Anti-hPG MAb 1	2,5 μ M (2,5 x10 ⁻⁵ M)
Anti-hPG MAb 2	185 nM (1,85 x10 ⁻⁶ M)
Anti-hPG MAb 3	6,4 nM (6,4 x10 ⁻⁹ M)
Anti-hPG MAb 4	3,5 nM (3,5 x10 ⁻⁹ M)
Anti-hPG MAb 5	13 pM (1,30 x10 ⁻¹¹ M)
Anti-hPG MAb 6	0,6 nM (6,38 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 7	58 pM (5,84 x10 ⁻¹¹ M)
Anti-hPG MAb 8	0,1 nM (1,08 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 10	3,6 nM (3,62 x10 ⁻⁹ M)
Anti-hPG MAb 11	0,3 nM (3,12 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 12	0,4 nM (4,43 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 13	0,6 nM (6,12 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 14	6,8 pM (6,86 x10 ⁻¹² M)
Anti-hPG MAb 15	0,2 nM (2,11 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 16	0,2 nM (2,78 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 17	8,3 nM (8,29 x10 ⁻⁹ M)
Anti-hPG MAb 18	1,2 nM (1,24 x10 ⁻⁹ M)
Anti-hPG MAb 19	0,7 nM (7,79 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 20	0,2 nM (2,47 x10 ⁻¹⁰ M)
Anti-hPG MAb 21	3,9 nM (3,90 x10 ⁻⁹ M)
Anti-hPG MAb 22	5 nM (4,94 x10 ⁻⁹ M)
Anti-hPG MAb 23	0,4 μ M (3,99 x10 ⁻⁷ M)

20 **Ejemplo 3: Agregación de anticuerpos anti-hPG**

La agregación de los anticuerpos puede reducir la eficacia terapéutica reduciendo la cantidad de anticuerpo disponible para unirse a la proteína diana. Los anticuerpos con niveles muy bajos de agregación resultan preferidos para aplicaciones terapéuticas. Cada lote de anticuerpo variará comparado con otros lotes del mismo anticuerpo monoclonal. Generalmente, es deseable usar lotes con agregación baja. Para cuantificar la agregación del anticuerpo, se pusieron disoluciones de anticuerpo en un espectrofluorímetro (Photon Technology International), y se irradiaron a 280 nm. La difusión se midió a 280 nm, mientras que la emisión debida a los aminoácidos aromáticos (principalmente triptófanos) se midió a 330 nm. El nivel de agregación se cuantificó calculando la relación entre los valores de medida de DO a 280 nm frente a 330 nm, como se describe en Nominé *et al.*, 2003, Biochemistry 42: 4909-4917. Una relación 280/330 nm alta indica una mayor cantidad de agregación. La concentración de anticuerpo usada fue 15 μ g/ml, 5 a 15 veces por encima de la usada para los tratamientos *in vitro*.

35 Los resultados se muestran en la Tabla 7 siguiente y en la figura 4.

Tabla 7

Muestra	Relación 280/330 nm
Albúmina de Suero Bovino (n=1)	6,4
Anti-hPG MAb 1 (n=1)	15,42
Anti-hPG MAb 2 (n=2)	9,81
Anti-hPG MAb 3 (n=2)	3,08

Anti-hPG MAb 4 (n=2)	1,94
----------------------	------

Ejemplo 4: Especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-hPG

5 La PG es sólo uno de los productos peptídicos del gen de la gastrina. Otros productos del gen de la gastrina tienen funciones en la homeostasis normal, pero es la función de PG en CRC lo que la hace una diana útil para propósitos terapéuticos y de diagnóstico. Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria son específicos para la progastrina de longitud completa por encima de todos los demás péptidos que resultan de la expresión y procesamiento del gen de la gastrina, tales como gastrinas extendidas con glicina (G17-gly), amidadas (Gastrina17) y el péptido flanqueante C-terminal (CTFP). Estos péptidos están presentes en la circulación. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-hPG se determinó ensayando los anticuerpos frente a la progastrina humana y otros péptidos derivados del gen de la gastrina, usando el ensayo ELISA descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

10 15 Específicamente, se recubrieron pocillos con una disolución que contiene uno de los péptidos siguientes a las cantidades indicadas: progastrina, hemocianina de lapa (KLH), gastrina-17 amidada (G17), gastrina 17 extendida con glicina (Ggly), o péptido flanqueante C-terminal (CTFP):

Péptidos de cribado	Cantidad de ensayo
Progastrina recombinante	50 ng (expt 1) 25 ng (expt 2)
Gastrina I humana amidada (G-17)	50 y 250 ng
Gastrina 17 extendida con glicina (G17-Gly)	50 y 250 ng
KLH	50 y 250 ng
Péptido flanqueante C-terminal (CTFP)	50 y 250 ng

20 25 En un primer experimento, se usaron 3 ng/ml (0,3 ng) de anti-hPG MAb 3 y 1 μ g/ml (0,1 μ g) de cada uno de los anti-hPG MAbs 1, 2, y 4. Ver la figura 5A. En un segundo experimento, se ensayó la especificidad de unión de los anti-hPG MAbs 5 a 14 y 21-23 a 0,3 ng/ml, ver la figura 5B, y la especificidad de unión de los anti-hPG MAbs 3, 15-20 se ensayó a 1 ng/ml, ver la figura 5C.

30 35 Los anticuerpos presentaron una reacción débil a cantidades elevadas de KLH que estaba acoplada al péptido antigénico usado en algunos de los inmunógenos para inmunizar los ratones en el Ejemplo 1 anterior. No hubo un efecto detectable de BSA en la unión a PG de ningún anticuerpo, incluyendo los generados frente a inmunógenos que incluían BSA como vehículo.

40 45 Todos los anticuerpos presentaron una alta especificidad para la unión a hPG de longitud completa (ensayado a 50 y después a 25 ng) comparado con otros péptidos derivados del gen de la gastrina, tales como gastrina-17 amidada, gastrina 17 extendida con glicina y el péptido flanqueante C-terminal, un péptido de 5 aminoácidos que se escinde de la progastrina durante el procesamiento normal del polipéptido para formar gastrina. Los anticuerpos ejemplificativos no mostraron una unión detectable (señal por encima del fondo de "PBS solo") frente a ninguno de los péptidos derivados del gen de la gastrina aparte de hPG.

Ejemplo 5: Ensayo de competición

50 55 La capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG para competir con un anticuerpo policlonal anti-hPG para unirse a la progastrina se determinó usando un ELISA con un anticuerpo anti-hPG "de captura" y un anticuerpo anti-hPG "de detección". El Anti-hPG MAb 3 se ensayó como se expone a continuación: se prerrrecubrieron placas de 96 pocillos con anticuerpos policloniales progastrina C-terminales generados frente a un péptido que consiste en los residuos 71 a 80 de hPG. Las placas se incubaron con 100 pM progastrina, seguido de la adición de 10 μ g/ml de anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal biotinilado, generado frente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 25, y concentraciones crecientes de anticuerpo monoclonal anti-hPG MAb 3. La unión del anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal biotinilado se detectó incubando las placas con estreptavidina-HRP seguido de OPD, según protocolos estándares. La unión se midió cuantificando la luminiscencia.

60 65 Los resultados muestran que concentraciones crecientes (μ g/ml) de Anti-hPG MAb 3 disminuyen la capacidad de anticuerpos policloniales anti-hPG de unirse a la progastrina, mostrando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo policlonal. Ver la figura 6.

Ejemplo 6: Mapeo de epítopos

70 75 80 Los epítopos específicos unidos por los anticuerpos monoclonales ejemplificativos se mapearon usando la técnica SPOT y escaneo de alanina, como se describe en Laune, D., *et al.*, 2002, *J. Immunol. Methods* 267: 53-70 y Laune, D., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 30937-30944, respectivamente. En la técnica SPOT, se generan 15 secuencias peptídicas de 15 aminoácidos que comprenden un epítopo putativo y se distribuyen en una membrana de nitrocelulosa que se ensaya con el anticuerpo de ensayo para determinar la mínima secuencia de

epítopo reconocida por el anticuerpo. El escaneo de alanina se usa para determinar los residuos en un epítopo que son críticos para la unión del anticuerpo: cada residuo en un epítopo putativo se muta uno a uno a una alanina, y los péptidos que contiene alanina se ensayan con el anticuerpo de ensayo.

5 Se identificaron familias de epítopos para anticuerpos ejemplificativos de la presente descripción. Para los anticuerpos monoclonales N-terminales frente a hPG MAbs 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), como se muestra en la tabla 8 siguiente.

10 Tabla 8

Mab	Antígeno peptídico PG: SWKPRSQQPDAPLG	SEC ID nº
Mab 2	WKPRSQQPDAPLG	32
Mab 4	WKPRSQQPDAPLG	32
Mab 1	PDAPLG	29
Mab 3	DAPLG	28
Mab 17	WKPRSQQPD	31
Mab 18	WKPRSQQPD	31
Mab 19	WKPRSQQPD	31
Mab 20	WKPRSQQPD	31
Mab 15	PRSQQPD	30
Mab 16	PRSQQPD	30

15 Para los anticuerpos monoclonales C-terminales frente a hPG MAbs 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 9 siguiente.

Tabla 9

Mab	Antígeno peptídico PG: QGPWLEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEC ID nº
Mab 14	GWMDFGRR	36
Mab 11	MDFGR	34
Mab 5	FGRR	33
Mab 6	FGRR	33
Mab 7	FGRR	33
Mab 9	FGRR	33
Mab 10	FGRR.E	33
Mab 12	FGRR	33
Mab 23	AEDEN	35

20 **Ejemplo 7: Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-hPG en estirpes celulares de cáncer**

(A) Actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG

25 Los anticuerpos monoclonales anti-hPG disminuyen la supervivencia celular en estirpes celulares de cáncer colorrectal representativas. Las estirpes celulares de cáncer colorrectal adecuadas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, HCT116, LS174T, SW480, y SW620 son estirpes celulares que se usan comúnmente para estudiar cáncer de colon, que producen y secretan progastrina. Los anticuerpos monoclonales frente a PG se ensayaron para su capacidad para inhibir la proliferación en estas diferentes estirpes celulares. La supervivencia de las células de cada una de HCT116, LS174T, SW480, y SW620 se ensayó usando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

30 Para cada experimento, se sembraron 50000 células en placas de 6 pocillos en medio que contiene suero fetal de ternera y se incubaron durante 8 horas. Se extrajo el suero a las células toda la noche y empezando 24 horas después de la siembra (tiempo "T0"), las células se trataron en duplicado cada 12h durante 48 horas, en ausencia de suero fetal de ternera, con 1 µg/ml de anticuerpos monoclonales control (anti-IgG1 humana de ratón, Calbiochem, Ref #411451) (CT mAb), o con 1 µg/ml de anti-hPG MAb 1-4 como se indica. Después de la cuantificación adicional de los anticuerpos monoclonales, se determinó que los anticuerpos se habían usado a aproximadamente 3 a 5 µg/ml. Se contó el número de células a T0 en un pocillo control, para cada experimento. Para las células HCT116, los experimentos se realizaron en presencia de 0,5% de suero fetal de ternera.

35 40 Despues de 48h del inicio del experimento, se contaron el número de células supervivientes en cada pocillo tres veces en un experimento ciego. La reducción en la proliferación o supervivencia de células de CRC se determinó calculando las células supervivientes tratadas con anti-hPG MAB como porcentaje de las células tratadas con MAb control. Los recuentos celulares al inicio del tratamiento (T0) se restaron de los recuentos celulares de ensayo y control medidos a las 48 horas. Específicamente, el número de células vivas tanto en los pocillos control como tratados con anti-hPG MAb se contó a las 48 horas, después se calculó la diferencia entre cada

recuento celular y el recuento celular determinado a T0, El número de células tratadas con anti-hPG MAB resultante se expresó como porcentaje del número de células tratadas con MAb control.

Las figuras 7A-C representan el efecto de anti-hPG MAb 3 y anti-hPG MAb 4 en la supervivencia de las células

5 SW480, células LS174T, y células HCT116 a partir de experimentos representativos. Los resultados son la media +/- S.E. de 4 pocillos de dos experimentos independientes. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo significativamente el número de células comparado con el tratamiento con el anticuerpo control. La significancia estadística se determinó usando un ensayo de la T de Student: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, y *** = $p < 0,001$. En cada estirpe celular, los anticuerpos anti-hPG redujeron la supervivencia celular. En una estirpe 10 celular, LST174T, los números de células al final de las 48 horas de tratamiento con anticuerpos anti-hPG fueron menores que los números de células al inicio del experimento, lo que sugiere que los anticuerpos producen la muerte celular, además de inhibir la proliferación celular.

15 La tabla 10 muestra el porcentaje de células de cáncer colorrectal SW480 supervivientes tratadas con cada uno de cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG comparado con un anticuerpo monoclonal control (anti-IgG1 humana de ratón, Calbiochem, Ref #411451) (CT mAb).

Tabla 10

SW480 (T0 = 26 667)	Número de células- T0	% del control	p (Tratado frente a Control) Mann Whitney, dos colas
mAb Control	36050 +/- 3228		
Anti-hPG MAb 1	30425 +/- 3098	84,4	0,3556
Anti-hPG MAb 2	28925 +/- 2757	80,2	0,0476
Anti-hPG MAb 3	6050 +/- 1788	16,8	< 0,0001
Anti-hPG MAb 4	17560 +/- 3439	48,7	0,0002

20 Comparado con el control, el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo la supervivencia de las células de cáncer un 83,2% (Anti-hPG MAb 3), 51,3% (Anti-hPG MAb 4), 19,8% (Anti-hPG MAb 2), y 15,6% (Anti-hPG MAb 1).

25 Las tablas siguientes muestran el porcentaje de células LS174T y HCT-116 supervivientes tratadas con anti-hPG MAb 3 y 4 comparado con el anticuerpo monoclonal control. Los datos se representan gráficamente en los paneles correspondientes de la figura 7.

Tabla 11

HCT-116 (T0 = 42,750)	Número de células-T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
MAb Control	151250 +/- 9071		
MAb3	62750 +/- 9194	41,5 %	< 0,0001
MAb4	82250 +/- 7435	54,4 %	< 0,0001

Tabla 12

LS 174T (T0 = 51,666)	Número de células - T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
MAb Control	85334 +/- 7520		
MAb3	-6666 +/- 5000	- 8 %	0,0084
MAb4	+8334 +/- 2500	7 %	0,0085

35 Bajo condiciones de ensayo *in vitro*, no se espera la inhibición completa del crecimiento celular. En cultivo celular, la progastrina es secretada continuamente por las células de cáncer y se acumula en el medio del cultivo celular. Se espera que los niveles de progastrina se incrementen en el tiempo más de lo que ocurriría en la circulación en el cuerpo, incrementando la relación de proteína diana a anticuerpo y diluyendo el efecto neutralizante de los anticuerpos. Así, se espera que el efecto neutralizante observado con los anticuerpos *in vitro* 40 sea más fuerte *in vivo*, cuando la progastrina secretada por las células de tumor sea transportada por la corriente sanguínea, disminuyendo su acumulación *in situ*.

45 La inhibición de la proliferación celular por los anti-hPG MAbs 5 a 23 se determinó en una o más de las estirpes celulares de CRC SW620, HCT116, y LS47T. Los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos como se ha descrito anteriormente usando 5 μ g/ml de anticuerpos monoclonales control o de ensayo (anti-hPG). Se sembraron 50000 células por pocillo para las células HCT116 y LS174T, y 100000 para las células SW620, Las tablas siguientes proporcionan el porcentaje de células supervivientes respecto al tratamiento control de experimentos representativos. Los resultados medios se representan en las figuras 7G-I para las estirpes celulares SW620, LS174T, y HCT-116 respectivamente.

Tabla 13

	Número de células-T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, dos colas
Experimento 1			
SW 620 (T0 = 103,067)			
MAb Control	82100 +/- 15489	-	
MAb 5	54511 +/- 8292	66 %	< 0,0001
MAb 6	44367 +/- 9321	54 %	< 0,0001
MAb 7	49279 +/- 8009	60 %	< 0,0001
MAb 8	32673 +/- 4680	40 %	< 0,0001
MAb 9	73283 +/- 3835	89%	0,1305
MAb 10	70178 +/- 4173	85 %	0,0618
Experimento 2			
SW 620 (T0 = 118,553)			
MAb Control	81347 +/- 6062		
MAb 11	46974 +/- 7422	58 %	0,0003
MAb 12	52980 +/- 10529	65 %	0,0002
MAb 13	38933 +/- 5284	48 %	0,0003
MAb 14	83767 +/- 9484	103 %	0,21
MAb 21	59497 +/- 2828	73 %	0,0002
MAb 22	64227 +/- 7123	79 %	0,0013
MAb 23	83914 +/- 5629	103 %	0,82
Experimento 3			
SW 620 (T0 = 116,283)			
MAb Control	101333 +/- 17626	-	
MAb 15	66052 +/- 7739	65 %	< 0,0001
MAb 16	58883 +/- 9950	58 %	< 0,0001
MAb 17	76688 +/- 5578	75,5 %	0,0014
MAb 18	75874 +/- 10129	75 %	0,0005
MAb 19	70242 +/- 10851	69 %	< 0,0001
MAb 20	66470 +/- 7557	66 %	< 0,0001

5 Tabla 14

	Número de células-T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
Experimento 1			
LS 174T (T0 = 60,944)			
MAb Control	107956 +/- 5859		
MAb 13	62341 +/- 10683	58 %	0,0003
MAb 16	65389 +/- 8185	61 %	0,0002
Experimento 2			
LS 174T (T0 = 86,389)			
Mab Control	241711 +/- 11620		
MAb 14	246444 +/- 19563	102 %	ns
MAb 19	204433 +/- 8946	84,5 %	0,0005
Experimento 3			
LS 174T (T0 = 79,667)			
MAb Control	135800 +/- 18338		
MAb 8	57333 +/- 12657	42 %	< 0,001

Tabla 15

	Número de células-T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
Experimento 1			

	Número de células-T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
HCT-116 (T0 = 49,286)			
MAb Control	78214 +/- 6230		
MAb 13	28805 +/- 3477	36 %	< 0,0001
MAb 16	56484 +/- 8333	72 %	< 0,0001
MAb 19	68945 +/- 8795	88 %	0,0302
Experimento 2			
HCT-116 (T0 = 60,944)			
MAb Control	122456 +/- 1697		
MAb 8	75867 +/- 15627	62 %	< 0,0001
MAb 16	87011 +/- 5091	71 %	< 0,0001

(B) Actividad neutralizante de anticuerpos policlonales anti-hPG

5 Los ensayos se realizaron como se ha descrito anteriormente, con las modificaciones siguientes. Se usó un anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal como se ha descrito en el Ejemplo 5. Como control, se usaron 3 µg/ml de policlonal (Policlonal anti-IgG humana de Conejo, Affinity BioReagents, Ref #SA1-600) (CT pAb). Para los tratamientos anti-PG, se usaron 3 µg/ml de anticuerpos policlonales anti-hPG para todas las estirpes celulares. SW480 y LS174T se trataron con anticuerpos policlonales anti-hPG control o N-terminales durante 24 a 48h en DMEM sin FCS, mientras que HCT116 se trataron con anticuerpos policlonales anti-hPG durante 48h en DMEM con 0,5% FCS. Las células supervivientes se tripsinizaron y contaron, en comparación con células tratadas con una concentración equivalente de anticuerpo policlonal control (anti IgG humana).

10 15 Los resultados de experimentos representativos se muestran en las tablas siguientes y en las figuras 7D-F. El tratamiento con anticuerpos policlonales anti-hPG redujo significativamente el número de células comparado con el tratamiento con anticuerpo control. La significancia estadística se determinó usando un ensayo de la T de Student: * = p<0,05, ** = p<0,01, y *** = p<0,001. Los números de células se expresan respecto al número de células en cultivo al inicio del experimento (T0). Para cada experimento, las células en cada uno de 4 pocillos se contaron tres veces. Como con los anticuerpos monoclonales anti-hPG, la proliferación de las células de cáncer colorrectal se inhibe por los anticuerpos policlonales anti-hPG, demostrando que los efectos antitumorales observados con los anticuerpos policlonales frente a progastrina son predictivos de manera razonable de la actividad de los anticuerpos monoclonales en el bloqueo del efecto de la progastrina en células de cáncer.

20 Tabla 16

	Número de células-T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
Experimento 1			
SW 480 (T0 = 26,667)			
PAb Control	37580 +/- 4233		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	0,0001
Experimento 2			
HCT-116 (T0 = 58,750)			
PAb Control	105350 +/- 8660		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	< 0,05
Experimento 3			
LS174T (T0 = 112,500)			
PAb Control	207500 +/- 10,000		
PG PAb	102500 +/- 5000	495 %	< 0,01

25 **Ejemplo 8: El efecto neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG se elimina cuando los anticuerpos se preincuban con hPG purificada**

30 Para demostrar que el efecto neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG está mediado por la unión a hPG, las células LS174T se cultivaron en presencia de un anticuerpo ejemplificativo - anti-hPG MAb 8 - que se había preincubado con y sin hPG. Como controles positivo y negativo, las células se cultivaron con hPG sola, un anticuerpo control solo, y el anticuerpo control preincubado con hPG.

35 Específicamente, se preincubó 33,3 nM (5 µg/ml) anti-hPG MAb 8 durante 1 hora a temperatura ambiente con un exceso molar de 20 veces de hPG recombinante, o 667 nM (6,67 µg/ml). Se usó progastrina humana

recombinante, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1. En paralelo, se preincubó de manera similar 33,3 nM (5 µg/ml) de anti-IgG1 humana murina (General BioScience, no. de referencia AB23420) con y sin hPG.

Se sembraron 5000 células LS174T en cada pocillo de placas de 96 pocillos en medio que contiene 10% suero fetal de ternera y se incubaron durante 8 horas, después de lo cual las células se cambiaron a medio sin suero y crecieron durante 12 horas más. Después de crecer en medio sin suero durante 12 horas, las células se trataron con uno de los siguientes cada 12 horas: anticuerpo control, anticuerpo control preincubado con hPG, anti-hPG MAb 8 solo, anti-hPG MAb 8 preincubado con hPG, y hPG sola. Después de 48 horas del primer tratamiento, se cuantificaron las células viables remanentes incubando las placas con Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution y registrando la absorbancia a 490 nM. La absorbancia medida para las células tratadas con el anticuerpo monoclonal control ("MAb control") se ajustó a 100%, y las demás condiciones experimentales se midieron frente a la absorbancia de las células tratadas con el MAb control. Los resultados se muestran en la tabla siguiente y en la figura 8.

15 Tabla 17

	Absorbancia	% del control	p (Tratado frente a Control) Mann Whitney, dos colas
Tratamiento con PG solo	0,244 +/- 0,088	132,5%	0,099 (n.s.)
MAb Control	0,184 +/- 0,084	100%	N.A.
Anti-hPG MAb 8	0,057 +/- 0,06	31%	0,001
MAb Control +hPG	0,321 +/- 0,079	174,5%	0,002
Anti-hPG MAb8 + hPG	0,271 +/- 0,076	147,6%	0,0229

La adición de, o la incubación de los anticuerpos con, hPG incrementa el número de células vivas en cultivo. Por el contrario, el tratamiento de las células con anti-hPG MAb 8 solo causa una reducción significativa en el número de células viables. Así, la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG para neutralizar la actividad de PG se suprime por la adición de hPG, que se cree que se une a y satura el anticuerpo. Este resultado confirma la especificidad de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG.

20 **Ejemplo 9: Actividad anti-tumoral *in vivo* de los anticuerpos anti-hPG**

25 Se han desarrollado varios modelos experimentales *in vivo* para el estudio de cáncer colorrectal. Se han desarrollado estudios con xenoinjerto en ratón, en los que tejido o células tumorales de estirpes celulares de cáncer humano se trasplantan en un ratón inmunodeficiente (denominado "desnudo"). Pocard M., *et al.*, *In vivo* (1996) 10(5): 463-469. También se han desarrollado varios modelos de ratón transgénico. Los modelos murinos incluyen mutaciones heterocigóticas en el gen de poliposis adenomatosa cólica (APC), tal como *Apc*^{Min}, 30 *Apc1638N*, *Apc716*, o *ApcΔ14*. El gen supresor de tumores APC codifica una proteína citosólica, APC, que, cuando está intacta, se une a y secuestra β-catenina en el citosol en un complejo multiproteico que dirige la β-catenina al proteasoma para degradación, evitando de esta manera que β-catenina active el factor de transcripción Tcf-4 en el núcleo. Heyer *et al.*, *Oncogene* 18: 5325-5333 (1999). Los ratones *APCΔ14* portan una 35 eliminación heterocigótica del exón 14 en el gen de poliposis adenomatosa cólica (APC). De manera similar a lo que ocurre en más del 70% de los pacientes con cáncer colorrectal esporádico, la pérdida somática de heterocigosidad (LOH) en el segundo alelo *Apc* ocurre en las células intestinales, lo que da lugar a una activación constitutiva del complejo transcripcional β-catenina/Tcf-4 y al desarrollo espontáneo de tumores intestinales en estos animales. El origen molecular de estos adenomas y carcinomas, así como la morfología 40 tumoral (incluyendo la vascularización, respuesta inflamatoria y presencia de células inmunitarias) con una gran similitud con la de los tumores humanos comparado con los modelos de xenoinjerto en ratón, hace de *APCΔ14* un modelo altamente relevante para los estudios de terapia de cáncer colorrectal humano. Colnot *et al.*, 2004, *Lab. Invest.* 84: 1619-1630. Otros modelos de ratón transgénico se basan en mutaciones en genes tales como MSH2, MSH6, CDX2, K-RAS, así como estirpes que combinan mutaciones en APC con mutaciones en otros 45 oncogenes. Heyer *et al.*, 1999, *Oncogene* 18: 5325-5333, Janssen KP *et al.*, 2002, *Gastroenterology* 123: 492-504. Estos modelos se usan ampliamente para estudiar el cáncer colorrectal y para ensayar hipótesis respecto al tratamiento del cáncer colorrectal.

50 Los ratones transgénicos portadores de una eliminación heterocigótica del exón 14 con el gen de poliposis adenomatosa cólica (*APCΔ14*) sirven como modelo para cáncer colorrectal, desarrollando tumores similares a los encontrados en cánceres de colon humanos. En un primer experimento, se trataron ratones *APCΔ14* con una preparación que contiene cantidades iguales de anticuerpos policlonales anti-hPG generados frente a (1) un péptido correspondiente a SEC ID nº: 25 y (2) un péptido C-terminal como se describe en Hollande *et al.*, documento WO 07/135542. Se trataron ratones de 3,5 meses de edad durante 5 semanas con anticuerpo 55 policlonal control o anticuerpo policlonal anti-hPG (dos ratones por tratamiento). Los anticuerpos se administraron por inyección intraperitoneal dos veces a la semana a una dosis de 10 mg/kg (150 µl volumen de inyección). Al final del tratamiento, los ratones se sacrificaron y los intestinos se lavaron con PBS, se disecaron para formación de imágenes digital y se fijaron en 4% paraformaldehído para análisis inmunohistoquímico. Se registró el número de tumores y las imágenes de tejido colorrectal.

La evaluación morfológica del tejido intestinal mostró que los anticuerpos anti-hPG no afectaban la renovación del epitelio intestinal murino sano. Se contaron los tumores en los grupos de tratamiento y control. El número total de tumores para los ratones tratados con anticuerpos control fue 27, comparado con 4 en los ratones tratados con anticuerpos anti-hPG. Así, los anticuerpos anti-hPG reducen el recuento de tumores más de 6,5 veces comparado con los anticuerpos control mientras que no afectan la renovación del epitelio sano en el intestino del ratón.

En un segundo experimento, se examinó el efecto de los anticuerpos anti-hPG en ratones APCΔ14 y ratones normales (control) (C57BL6J). Se trataron ratones de 4 meses de edad dos veces a la semana durante 6 semanas con anticuerpo policlonal control -un antisuero anti-IgG humana de conejo (Jackson ImmunoResearch (no. de referencia 309-005-0089)- o anticuerpo policlonal anti-hPG, por inyección intraperitoneal dos veces a la semana a una dosis de 9 mg/kg (150 μ l volumen de inyección). Despues de seis semanas de tratamiento, dos horas antes del sacrificio, se inyectó a los ratones Bromo-desoxi-uridina (BrdU) (2 mg por ratón, inyección intraperitoneal). Se trataron 6 ratones APCΔ14 con policlonal anti-hPG y 4 con anticuerpos policlonales control. Los anticuerpos control y anti-hPG se administraron a 6 ratones normales (C57BL6J) cada uno. No se detectaron anormalidades intestinales en ninguno de los ratones de ningún grupo, lo que demuestra adicionalmente la seguridad y ausencia de efectos adversos de los anticuerpos anti-hPG en tejido intestinal normal.

El número y tamaño de los tumores (altura y longitud) se examinaron en los grupos tratados frente a control de ratones APCΔ14. El tamaño de los tumores se determinó por medidas de las imágenes tomadas de los intestinos de cada animal, preparado como se expone a continuación. Los intestinos se lavaron como se ha descrito anteriormente, se disecaron longitudinalmente, se incluyeron en parafina y se procesaron para inmunohistoquímica usando la técnica *Swiss roll*. Las medidas de la longitud y altura tumorales se realizaron usando el programa informático Image J.

Los resultados se muestran en la tabla 18 y en las figuras 8A y B. Los resultados del tamaño tumoral muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados control y tratados con anti-hPG. La significancia estadística se determinó usando un ensayo de Mann Whitney: * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, y *** = $p<0,001$. Los ratones tratados con el anticuerpo control presentaron un total de 125 tumores, con 31,25 tumores de media por ratón. Los ratones tratados con anti-hPG presentaron 46 tumores o una media de 7,6 tumores por ratón. Esta diferencia es estadísticamente significativa (ensayo de Mann-Whitney, $P= 0,0095$) mostrando que los anticuerpos anti-hPG reducen significativamente el número de tumores de cáncer colorrectal *in vivo*.

Tabla 18

Tratamiento (no. de ratones)	Número de tumores por ratón					
PAb Control (4)	23	48	28		26	
Anti-hPG PAb (6)	2	16	15	9	2	2

Los anticuerpos anti-hPG reducen significativamente los tumores de cáncer colorrectal *in vivo* según se mide por la reducción tanto en el número de tumores como en el tamaño de los tumores en un modelo murino de cáncer colorrectal, sin ningún efecto adverso aparente en el epitelio colorrectal normal. Así, el tratamiento de tumores de cáncer colorrectal con anti-hPG proporciona un beneficio terapéutico *in vivo*.

Ejemplo 10: Diseño de anticuerpos anti-hPG humanizados

Se diseñaron anticuerpos humanizados *in silico* a partir de los anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos MAbs 3, 4, 8, 13, 16, y 19. El diseño de los anticuerpos humanizados se realizó según la metodología descrita en 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. Para cada uno de los anticuerpos monoclonales murinos, a las secuencias peptídicas de V_H y V_L humanizadas correspondientes se determinaron: identificando las regiones CDR y marco de las secuencias murinas usando la base de datos IMGT-ONTOLOGY (Duroux *et al.*, 2008, Biochimie, 90: 570-583; Giudicelli y Lefranc, 1999, Bioinformatics, 15: 1047-1054) y las bases de datos y herramientas IMGT® (Ehrenmann *et al.*, 2010, Nucl.Acids. Res., 38: D301-307; Brochet *et al.*, 2008, Nucl.Acids. Res., 36: W503-508) seguido de la identificación de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de la región marco humanas más próximas en IMGT/GENE-DB (Giudicelli *et al.*, 2005, Nucl.Acids. Res., 33: D256-261), e injertando las secuencias CDR murinas en las regiones marco humanas. Más particularmente, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los dominios V_H y V_L murinos se analizaron usando IMGT/V-QUEST e IMGT/DomainGapAlign para delimitar las regiones CDR y marco murinas, definir las longitudes de CDR e identificar los aminoácidos de anclaje. Los aminoácidos de anclaje son los residuos en la posición 26, 39, 55, 66, 104 y 118 de IMGT "Collier de Perles" que apoyan CDR1-IMGT, CDR2-IMGT, CDR3-IMGT (Kaas y Lefranc, 2007, Current Bioinformatics, 2: 21-30; Kaas *et al.*, Brief. Funct. Genomic Proteomic, 2007, 6: 253-264). Se identificaron los genes V (variable) y J (de unión) humanos más próximos a las secuencias murinas y se seleccionaron los genes más adecuados. Los aminoácidos individuales en la región marco murina se mantuvieron si se consideró que posiblemente contribuían a la especificidad del anticuerpo en comparación con estructuras 3D conocidas (Kaas *et al.*, 2004, Nucl. Acids. Res. 32: 208-210) usando IMGT Collier de Perles en dos capas.

Se determinó que las CDR de V_H para MAb 3 tenían una longitud de 8, 8, y 8 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 3 V_H murina, IGHV1-5*01, se diferenciaba en 10 residuos, 3 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de

5 los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados (I29 en CDR1, F56 y S65 en CDR2). Además, se consideró que V39, G55, y R66 eran potencialmente importantes para mantener la especificidad y se mantuvieron en el diseño. El gen de la estirpe germinal humano más próximo fue IGHV1-3*01 (63,3% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 27 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la Treonina-123 y la Leucina-124 por Leucina-123 y Valina-124, para equiparar con el gen IGHJ1*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 3 es 87,8% idéntica a la región variable para IGHV1-46*03 y 88 de los 91 aminoácidos en las cuatro regiones marco son idénticos.

10 Se determinó que las CDR de V_L para MAb 3 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 3 V_L murina, IGKV1-117*01, se diferenciaba en un único residuo mapeado en una región marco. El gen de la estirpe germinal humana más próximo fue IGKV2-30*02 (81% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 14 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. Los residuos E40 y F68 se han mantenido en la secuencia 15 humanizada proyectada. En la región marco 4, se cambió la Leucina-124 por Valina-124, para equiparar con el gen IGKJ4*01 humano. Globalmente, la secuencia V_L humanizada para MAb 3 es 93% idéntica a IGKV2D-29*02 y 87 de los 89 aminoácidos en las cuatro regiones marco son idénticos.

20 Las secuencias de V_H y V_L proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

25

Tabla 19

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
21	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFTSYWVHWVRQAPGQRLEWMGGF YPGNNSDSRYSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRRDSPQY WGQGTLVTVSS	h V_H 3
22	DVVMQTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGT KVEIK	h V_L 3

30 Se determinó que las CDR de V_H para MAb 4 tenían una longitud de 8, 8, y 11 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 4 V_H murina, IGHV1-9*01, se diferenciaba en 11 residuos, 4 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados (S35, S36, y S37 en CDR1, F56 en CDR2). Además, se consideró que D66 era potencialmente importante para mantener la especificidad y se mantuvo en el diseño. El gen de la estirpe germinal humana más próximo fue IGHV1-46*03 (64,9% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 27 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Alanina-128 por Serina-128, para equiparar con el gen IGHJ5*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 4 es 91,8% idéntica a la región variable para IGHV1-46*03 y 90 de los 91 aminoácidos en las cuatro regiones marco son idénticos.

35

40 Se determinó que las CDR de V_L para MAb 4 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 4 V_L murina, IGKV1-110*01, se diferenciaba en 3 residuos, 2 de los cuales se mapearon en CDR1 (serina-34 y valina-36) y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. El gen de la estirpe germinal humana más próximo fue IGKV2D-29*02 (81% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 11 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la serina-120 por glutamina-120, para equiparar con el gen IGKJ2*01 humano. Globalmente, la secuencia V_L humanizada para MAb 4 es 92% idéntica a IGKV2D-29*02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

45

50 Las secuencias de V_H y V_L proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 20

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
23	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFSSSWMHWVRQAPGQGLEWMGIFLPG SGSTDYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCATDGNYDWFAYW GQGTLVTVSS	h V_H 4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSSGVTYLYWYLQKPGQSPQLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK	h V_L 4

Se determinó que las CDR de V_H para MAb 8 tenían una longitud de 8, 8, y 10 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb8 V_H murina, IGHV5-9-3*01, se diferenciaba en 5 residuos, 4 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de

5 los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la estirpe germinal humana más próximos fueron IGHV3-21*01 y *02 (80,4% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 12 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la serina-123 y la leucina-124 por treonina-123 y valina-10

10 124, respectivamente, para equiparar con el genIGHJ6*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 8 es 92,8% idéntica a la región variable para IGHV3-21*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco. Existe un sitio potencial de N-glicosilación en la V_H CDR3 murina para MAb8.

Se determinó que las CDR de V_L para MAb 8 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 8 V_L murina, IGKV2-15

10 109*01, se diferenciaba en 6 residuos, 4 de los cuales se mapearon en CDR1 y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la estirpe germinal humana más próximos fueron IGKV2-28*01 y IGKV2D-28*01 (75% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base

20 IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 12 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la alanina-120, leucina-124, y leucina 126 por glicina-120, valina-124, e isoleucina-126, respectivamente, para equiparar con el gen IGKJ4*01 humano. Globalmente, la secuencia V_L humanizada para MAb 8 es 87% idéntica a IGKV2-28*01 y IGKV2D-28*01 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

Las secuencias de V_H y V_L proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

25

Tabla 21

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
75	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGGTYTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVVS	h V_H 8a
76	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASICRSSKSLRHTKGITFLDWYLQKPGQSPQLLIYQMSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKEIK	h V_L 8a
77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGGTYTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVVS	h V_H 8b
78	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASICRSSKSLRHTKGITFLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPLTFGGGTKEIK	h V_L 8b
79	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVVS	h V_H 8b

30 Se determinó que las CDR de V_H para MAb 13 tenían una longitud de 8, 8, y 7 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 13 V_H murina, IGHV5-6-3*01, se diferenciaba en 10 residuos, 5 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la estirpe germinal humana más próximos fueron IGHV3-7*01 y *02 (78,6% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base

35 IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 13 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la treonina-123 y la leucina-124 por leucina-123 y valina-124, respectivamente, para equiparar con el genIGHJ4*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 13 es 91,8% idéntica a la región variable para IGHV3-7*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

40

Se determinó que las CDR de V_L para MAb 13 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 13 V_L murina, IGKV1-135*01, se diferenciaba en un único residuo localizado en una región marco. Los genes de la estirpe germinal humana más próximos fueron IGKV2-30*01 y *02 (81% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base

45 IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 13 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la leucina-124 por valina-124, para equiparar con el gen IGKJ4*01 humano. Globalmente, la secuencia de V_L humanizada para MAb 13 es 94% idéntica a IGKV2-30*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

Las secuencias de V_H y V_L proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

50

Tabla 22

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
------------	--------------------------	----------

80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIGSSYGMSWVRQAPGKGLEWVANINTFG DRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWQGQTLV TVSS	hV _H 13a
81	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV SNRDSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWFQGTHFPQTFGGGTKEI K	hV _k 13a
82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIGSSYGMSWVRQAPGKGLEWVASINTFG DRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWQGQTLV TVSS	hV _H 13b
83	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV SKRDSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWFQGTHFPQTFGGGTKEI K	hV _k 13b

Se determinó que las CDR de V_H para MAb 16 tenían una longitud de 8, 8, y 10 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 16, V_H murina, IGHV1-53*01, se diferenciaba en 7 residuos, 2 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la estirpe germinal humana más próximos fueron IGHV1-46*01 y *03 (71,4% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 25 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Leucina-124 por Valina-124, para equiparar con el gen IGHJ6*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 16 es 96,9% idéntica a la región variable para IGHV1-46*01 y *03 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

Se determinó que las CDR de V_L para MAb 16 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 16, V_L murina, IGKV1-135*01, se diferenciaba en 4 residuos localizados en una región marco. Los genes de la estirpe germinal humana más próximos fueron IGKV2-30*01 y *02 (79% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign), que se diferenciaban en un aminoácido en CDR1. Se encontraron 15 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la glicina-120 por glutamina-120, para equiparar el gen IGKJ2*01 humano. Globalmente, la secuencia de V_k humanizada para MAb 16 es 94% idéntica a IGKV2-30*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

Las secuencias de V_H y V_k proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 23

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
84	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPS NGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTRGYYYPFDYWG QGTTVTVSS	hV _H 16a
85	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLV SNRDSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWFQGTHSPYTFGGTKEI K	hV _k 16a
86	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWMGIINPS NGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTRGYYYPFDYWG QGTTVTVSS	hV _H 16b
87	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLYWFQQRPGQSPRRLIYLV SNRDSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWFQGTHSPYTFGGTKEI K	hV _k 16b
88	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGLEWMGEINP SNGGTYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTRGYYYPFDYWG GQGTTVTVSS	hV _H 16c
89	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLYWFQQRPGQSPRRLIYLV SERDSGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWFQGTHSPYTFGGTKEI K	hV _k 16c

Se determinó que las CDR de V_H para MAb 19 tenían una longitud de 9, 7, y 14 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 19 V_H murina, IGHV3-2*01, se diferenciaba en 5 residuos, 2 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. El gen de la estirpe germinal humana más próximo fue IGHV4-30-4*01 (72,4% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Sin embargo, como este gen es polimórfico, se seleccionaron IGHV4-31*02 y *03 (71,4% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 21 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la isoleucina-123 por leucina-123, para equiparar con el gen IGHJ4*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 19 es 91,9% idéntica a la región variable para IGHV4-31*02 y *03 y

100% idéntica para las cuatro regiones marco.

Se determinó que las CDR de V_L para MAb 19 tenían una longitud de 7, 7, y 13 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la estirpe germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 19 V_L murina, 5 IGLV3*01, se diferenciaba en 8 residuos, 5 de los cuales se localizaron en una CDR. Los genes de la estirpe germinal humana más próximos fueron IGLV4-69*01 y *02 (69,9% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 23 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la estirpe germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la valina-124 por 10 leucina-124, para equiparar con el gen IGLJ3*01 humano. Alternativamente, el gen IGJK4*01 puede usarse para la región marco 4. Globalmente, la secuencia de V_k humanizada para MAb 19 es 92,4% idéntica para IGLV4-69*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

Las secuencias de V_H y V_k proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

15 Tabla 24

SEC ID nº:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
90	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITS DYAWSWIRQHPGKGLEWIGYISFS GYTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCAREVNYGDSYHFDY WGQGTLTVSS	V_{H19a}
91	QLVLTQSPSASASLGASV KLTCTLSSQHRTYTI AWHQQQPEKGPRYLMKVKKD SHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGG TKVEIK	V_{k19a}
92	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITS DYAWN WIRQHPGKGLEWIGYISFS GYTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCAREVNYGDSYHFDY WGQGTLTVSS	V_{H19b}
93	QLVLTQSPSASASLGASV KLTCTLSSQHRTYTI EWHQQQPEKGPRYLMKVKKD SHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGG TKVEIK	V_{k19b}
94	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITS DYAWN WIRQHPGKGLEWIGYISFS GYTSYNPSLKS RVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCAREVNYGDSYHFDY WGQGTLTVSS	V_{H19c}
95	QLVLTQSPSASASLGASV KLTCTLSSQHRTYTI EWHQQQPEKGPRYLMEVKKDG SHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGG TKVEIK	V_{k19c}

Listado de secuencias

20 <110> BIOREALITES, S.A.S. CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) INSTITUT
NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA PROGASTRINA Y SUS UTILIZACIONES
25 <130> N111981
<150> 61/252.625
<151> 2009-10-16
30 <160> 99
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
35 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <221> fuente
<223>/nota=" Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético "
<400> 1
45 Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5
<210> 2

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

5 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 2

10 Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 8

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 3

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr
 1 5

25 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

35 <400> 4

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10

40 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 5

Lys Val Ser
 50 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

60 <400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr
 1 5

5 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp
 1 5
 15 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 20 <400> 8
 25 Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 9
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 35 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 9
 Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 40 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 50 <400> 10
 Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr
 1 5 10
 55 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 11

ES 2 690 943 T3

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
1 5

5 <210> 12
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la 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

15 <210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

25 <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 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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14

ES 2 690 943 T3

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

5 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 14

10 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
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
20 <223>/nota="Descripción de la 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 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

25 <210> 16
<211> 345
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 690 943 T3

<220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

5

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

10 <400> 16

gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct 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 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 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 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 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 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 Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr 100 105 110 gtc tcc tca Val Ser Ser 115	48 96 144 192 240 288 336 345
--	--

15 <210> 17
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)

<400> 17

ES 2 690 943 T3

<pre> 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 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80 agc aga ctg 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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110 </pre>	48 96 144 192 240 288 336
---	---

<210> 18

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

15 <400> 18

<pre> 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 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 Leu Val Thr Val Ser Ala 115 </pre>	48 96 144 192 240 288 336 354
---	--

20 <210> 19

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

ES 2 690 943 T3

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

5 <400> 19

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

10 <210> 20

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 20

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

20 <210> 21

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 21

ES 2 690 943 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la 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 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

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

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 23

ES 2 690 943 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la 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

15

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 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

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

25

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

ES 2 690 943 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15) .. (15)

10 <223> Ahx

<400> 26

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

15 <210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 27

Gln Gly Pro Trp Leu 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

25 <210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 28

Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

<210> 29

35 <211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

40 Pro Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

<210> 30

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

50 Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

55 <213> Homo sapiens

<400> 31

Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
1 5

5 <210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
 1 5 10
 10 <210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 33
 Phe Gly Arg Arg
 1
 20 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 34
 Met Asp Phe Gly Arg
 1 5
 30 <210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 35 Ala Glu Asp Glu Asn
 1 5
 <210> 36
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg
 45 1 5
 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 55 <400> 37
 Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala
 1 5
 60 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
6 <220>
7 <221> fuente
8 5 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
9 <400> 38
10 Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
11 1 5
12 <210> 39
13 <211> 8
14 <212> PRT
15 <213> Secuencia artificial
16 <220>
17 <221> fuente
18 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
19 <400> 39
20 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
21 1 5
22 <210> 40
23 <211> 9
24 <212> PRT
25 <213> Secuencia artificial
26 <220>
27 <221> fuente
28 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
29 <400> 40
30 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala
31 1 5
32 <210> 41
33 <211> 8
34 <212> PRT
35 <213> Secuencia artificial
36 <220>
37 <221> fuente
38 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
39 <400> 41
40 Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
41 1 5
42 <210> 42
43 <211> 8
44 <212> PRT
45 <213> Secuencia artificial
46 <220>
47 <221> fuente
48 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
49 <400> 42
50 Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr
51 1 5

5 <210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <400> 43
 Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr
 1 5
 15 <210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 44
 Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr
 25 1 5
 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 35 <400> 45
 Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe
 1 5 10
 40 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 46
 50 Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr
 1 5
 <210> 47
 <211> 10
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 60 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 47

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

5 <210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 48

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

15 15 <210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 49

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

30 <210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 50

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
40 1 5 10

45 <210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 51

Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
1 5

55 <210> 52
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

5 <400> 52
6 Gln Met Ser
7 1
8 <210> 53
9 <211> 3
10 <212> PRT
11 <213> Secuencia artificial
12 10
13 <220>
14 <221> fuente
15 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
16 15 <400> 53
17 Leu Val Ser
18 1
19 <210> 54
20 <211> 7
21 <212> PRT
22 <213> Secuencia artificial
23 20
24 <220>
25 <221> fuente
26 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
27 <400> 54
28 30 Val Lys Lys Asp Gly Ser His
29 1 5
30 <210> 55
31 <211> 9
32 <212> PRT
33 <213> Secuencia artificial
34 35
35 <220>
36 <221> fuente
37 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
38 40 <400> 55
39 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
40 1 5
41 45 <210> 56
42 <211> 9
43 <212> PRT
44 <213> Secuencia artificial
45 50 <220>
46 <221> fuente
47 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
48 <400> 56
49 55 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr
50 1 5
51 <210> 57
52 <211> 9
53 <212> PRT
54 <213> Secuencia artificial
55 60
56 <220>

<221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

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

<210> 58
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

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

20 <210> 59
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

30 <400> 59
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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

35 <210> 60
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 60

ES 2 690 943 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 61

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la 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

15

<210> 62

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 62

ES 2 690 943 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la 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

15

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 64

ES 2 690 943 T3

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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 65

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la 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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 66

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 66

ES 2 690 943 T3

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 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 Thr Lys Val
 100 105 110

Thr Val Leu
 115

<210> 67

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

15 <400> 67

gaa gtg cag ctg gtg gaa tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Thr Tyr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggt cga ttc acc atc tcc aga gac aat gco 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

20 <210> 68

<211> 342

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

ES 2 690 943 T3

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> CDS

5 <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	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val
	50		55			60										
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aqa	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															

10

<210> 69

<211> 351

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

20 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (351)

<400> 69

25

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	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	gtt	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	gct	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	Tyr	Tyr	Pro	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	
	100		105			110										
ctc	aca	gtc	tcc	tca												351
Leu	Thr	Val	Ser	Ser												
	115															

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

10 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)

15 <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	gca	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	Tyr	Trp	
				100		105		110								
caa	ggc	acc	att	gtc	aca	gtc	tcc	tca								363
Gln	Gly	Thr	Ile	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
				115		120										

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

25 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

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

<400> 71

ES 2 690 943 T3

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly	
1 5 10 15	
aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act	96
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Arg His Thr	
20 25 30	
aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct	144
Lys Gly Ile Thr Phe Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cct 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 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile	
65 70 75 80	
agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn	
85 90 95	
cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa	336
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
100 105 110	
<210> 72	
<211> 336	
5 <212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<221> fuente	
10 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"	
<220>	
<221> CDS	
15 <222> (1)..(336)	
<400> 72	
gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tgc gtt acc att gga	48
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly	
1 5 10 15	
caa cca gcc tcc atc tcc tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt	96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu 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 gca 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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	
20 <210> 73	
<211> 336	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
25 <220>	
<221> fuente	
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"	
30 <220>	
<221> CDS	

ES 2 690 943 T3

<222> (1)..(336)		
<400> 73		
	gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att ggg Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly 1 5 10 15	48
	cgc cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta gac agt Arg Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser 20 25 30	96
	gat gga aag aca tat ttg tat tgg ttg tta cag agg cca ggc cag tct Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser 35 40 45	144
	cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct gag ctg gac tct gga gtc cct Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro 50 55 60	192
	gac agg atc act ggc agt ggg tcg ggg aca gat ttc aca ctg aag atc Asp Arg Ile Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 65 70 75 80	240
	agc aga gtg gag gct gag gat ttg cga gtt tat tat tgc tgg caa gga Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly 85 90 95	288
5	aca cat tct ccg tac acg ttc gga ggg acc aag ctg gaa ata aaa Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105 110	336
	<210> 74	
	<211> 345	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"	
15	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(345)	
20	<400> 74	
	caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala 1 5 10 15	48
	tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr 20 25 30	96
	att gaa tgg tat cag caa cag tca ctc aag cct cct aag tat gtg atg Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met 35 40 45	144
	gag gtt aag aaa gat gga agc cac agc aca ggt cat ggg att cct gat Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp 50 55 60	192
	cgc ttc tct gga tcc agt tct ggt gct gat cgc tac ctc agc att tcc Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser 65 70 75 80	240
	aac atc cag cct gaa gat gaa gca ata tac atc tgt ggt gtg ggt gat Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp 85 90 95	288
	gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Thr Lys Val 100 105 110	336
	act gtc cta Thr Val Leu 115	345
25	<210> 75	
	<211> 117	
	<212> PRT	

ES 2 690 943 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223>/nota="Descripción de la 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

10

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

20 <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 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 77

25

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente

ES 2 690 943 T3

<223>/nota="Descripción de la 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
5 115

<210> 78

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15

<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 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

20 <210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 79

30

ES 2 690 943 T3

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

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la 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

15

<210> 81

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 81

ES 2 690 943 T3

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe 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 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

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

<210> 82

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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

15

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 83

ES 2 690 943 T3

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe 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 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

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

<210> 84

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 84

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 85

ES 2 690 943 T3

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 86

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 86

15

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

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 87

ES 2 690 943 T3

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe 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 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

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

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

5 <210> 88

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 88

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 89

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 89

ES 2 690 943 T3

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

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

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

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

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

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

5 <210> 90
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 90

15 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

20 <210> 91
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 91

ES 2 690 943 T3

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 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 Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 92

5 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 92

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 93

<211> 115

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 93

ES 2 690 943 T3

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 Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45

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

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

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

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

Glu Ile Lys
115

5 <210> 94
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 94

15 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

20 <210> 95
<211> 115
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 95

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala

ES 2 690 943 T3

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 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 Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 96

<211> 29

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2) .. (3)

15 <223> Ahx

<400> 96

Cys Xaa Xaa Gln Gly Pro Trp Leu 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

20

<210> 97

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2) .. (3)

<223> Ahx

35

<400> 97

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

<210> 98

40 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11) .. (12)
<223> Ahx

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

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

20 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 99
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal anti-hPG que se une específicamente a una región C-terminal de la progastrina humana (hPG), que comprende las CDR de V_H y V_L siguientes:
 - 5 V_H CDR1 de SEC ID nº: 37, V_H CDR2 de SEC ID nº: 41, V_H CDR3 de SEC ID nº: 45, V_L CDR1 de SEC ID nº: 49, V_L CDR2 de SEC ID nº: 52, y V_L CDR3 de SEC ID nº: 55.
 - 10 2. Anticuerpo monoclonal anti-hPG según la reivindicación 1, que proporciona una reducción significativa estadísticamente en el número de células de cáncer colorrectal vivas tras el tratamiento *in vitro* de una muestra de ensayo en comparación con una muestra de control tratada con un anticuerpo monoclonal no específico.
 - 15 3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2, en el que dichas células de cáncer colorrectal son las células de LS174T.
 4. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo es seleccionado de entre el grupo que consiste en: anticuerpos híbridos, primatizados y humanizados.
 - 20 5. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las cadenas V_H y V_L que presentan unas secuencias representadas por SEC ID nº 59 y SEC ID nº 63, respectivamente.
 6. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está humanizado.
 - 25 7. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 6 que comprende unas cadenas V_H y V_L que presentan unas secuencias seleccionadas de entre uno de los grupos de secuencias de V_H y V_L siguientes:
 - (i) V_H de SEC ID nº: 75 y V_L de SEC ID nº: 76;
 - (ii) V_H de SEC ID nº: 77 y V_L de SEC ID nº: 78; y,
 - 30 (iii) V_H de SEC ID nº: 79 y V_L de SEC ID nº: 76.
 8. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que presenta una afinidad en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 7 nM.
 - 35 9. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, estando dicho anticuerpo conjugado a una fracción.
 10. Composición que comprende un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un excipiente, vehículo y/o diluyente.
 - 40 11. Composición según la reivindicación 10 que se formula para una utilización farmacéutica.
 12. Primer polinucleótido que codifica una cadena ligera variable (V_L) y segundo polinucleótido que codifica una cadena pesada variable (V_H) o polinucleótido único que codifica tanto las cadenas ligera como la pesada variables (V_L y V_H), para expresar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 - 45 13. Vector de expresión que comprende un primer polinucleótido que codifica una cadena ligera variable (V_L) y un segundo polinucleótido que codifica una cadena pesada variable (V_H) o un polinucleótido único que codifica las cadenas ligera y pesada variables (V_L y V_H), para expresar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 - 50 14. Célula hospedadora transformada con un primer polinucleótido que codifica una cadena ligera variable (V_L) y un segundo polinucleótido que codifica una cadena pesada variable (V_H) o un polinucleótido único que codifica las cadenas ligera y pesada variables (V_L y V_H), para expresar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 - 55 15. Híbridoma apto para secretar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
 - 60 16. Anticuerpo monoclonal anti-hPG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su utilización en el tratamiento del cáncer colorrectal.
 - 65 17. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 16, en el que tratar el cáncer colorrectal implica administrar dicho anticuerpo en combinación con un segundo agente terapéutico.

18. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 17, en el que dicho anticuerpo y dicho segundo agente terapéutico son administrados simultánea, sucesiva o separadamente.
19. Anticuerpo para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18, en el que dicho segundo agente terapéutico es un agente quimioterápico o un anticuerpo terapéutico.
- 5 20. Anticuerpo para la utilización según la reivindicación 19, en el que dicho segundo anticuerpo terapéutico es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR o un anticuerpo monoclonal anti-VEGF.

FIG. 1

Preprogastrin:	<u>M QRLCVYVLIF ALALAAFSEA</u>	SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LELPWLEQQG
	-21	-11	11	21
	PASHHRRQLG	PQGPPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWMD
31	41	51	61	71
Progastrin:				
		SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LELPWLEQQG
		1	11	21
	PASHHRRQLG	PQGPPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWMD
31	41	51	61	71
G34 :	QLG PQGPPPHLVAD	PSKKKEGPWLE	EEEEAYGWMD	F - NH ₂
	41	51	61	71
G34 - Gly:	QLG PQGPPPHLVAD	PSKKKEGPWLE	EEEEAYGWMD	FG
	41	51	61	71
G17 :		EGPWLE	EEEEAYGWMD	F - NH ₂
		61	71	
G17 - Gly:		EGPWLE	EEEEAYGWMD	FG
		61	71	
CTFP:			SAEDEN	
				75

FIG. 2A

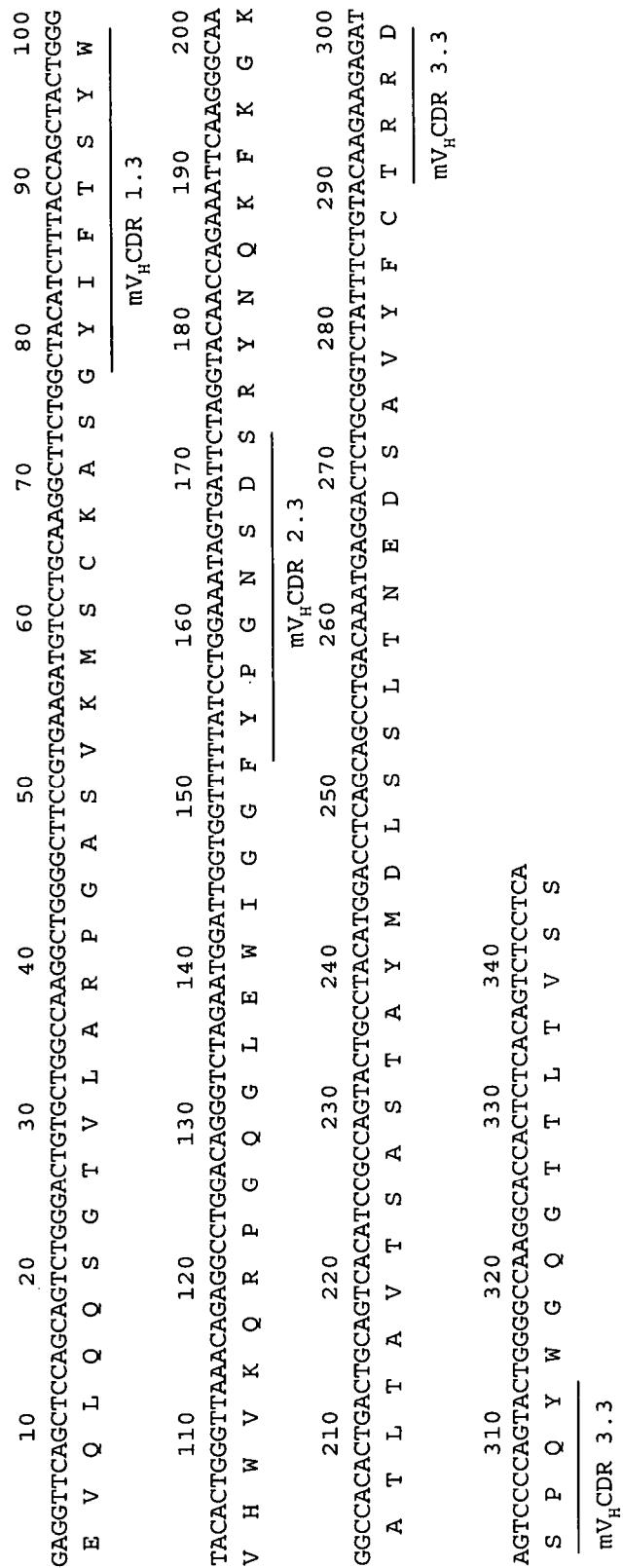


FIG. 2B

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N	<hr/> <i>mV_L CDR 1.3</i>									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F	<hr/> <i>mV_L CDR 2.3</i>									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
S G S G T D F T L K I S R L E A E D L G V Y C F Q G S H V P	<hr/> <i>mV_L CDR 3.3</i>									
310	320	330								
TTCACGTTGGAGGGACCAAGCTGGAAATAAAA										
F T F G G G T K L E I K	<hr/> <i>mV_L CDR 3.3</i>									

FIG. 2C

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAGGGTTCA GTTGGCAGCAGTCTGGAGGTGATGAAAGCCAGGGGCCCTCAGTGAAGATAATCCTGCAAGGGCTACTGGCTACACATTCA GTGCTCCCTGGAA
 Q V L Q S G A E L M K P G A S V K I S C K A T G Y T F S S W

 mV_H CDR 1.4

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TAGAGTGGTTAAACAGAGGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGTTTACCTGGAAAGTGGTAGTACAGACTACAAATGAGAAGTTCAAGGGCAA
 I E W L K Q R P G H G L E W I G E F L P G S T D Y N E K F K G K

 mV_H CDR 2.4

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGCACATTCACTGCAGACACATCCTCCGACACAGCCTACATGCTACTCAGCAGGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAACTSATGGT
 A T F T A D T S S D T A Y M L L S S L T S E D S A V Y C A T D G

 mV_H CDR 3.4

310 320 330 340 350
 ATTATGACTGGTTTGCCTTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 N Y D W F A Y W G Q G T L V T V S A

 mV_H CDR 3.4

FIG. 2D

FIG. 2E

90

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
E	V	Q	L	V	E	S	G	G	T
M	S	W	V	R	Q	T	P	E	K
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N

mV_HCDR 1.8

110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
M	S	W	V	R	Q	T	P	E	K
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N

mV_HCDR 2.8

210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
M	S	W	V	R	Q	T	P	E	K
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N

mV_HCDR 3.8

310	320	330	340						
N	Y	S	L	D	F	W	G	Q	T
F	T	I	S	R	D	N	A	K	N

mV_HCDR 3.8

FIG. 2F

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
GACATTGTGATGACGCAGGCTGCATCCCTTAATCCAGTCACCTGGAACATCCGGCTTCCATCTCCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCGACATACTAAAG	D I V M T Q A A S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L R H T K									
										mV _L CDR 1.8
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
GCATCACTTTTGTATTGGTATCTGCGAGAACGCCAGGCCAGTCTCAGCTCCCTGATTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGCAGGTT	G I T F L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L A S G V P D R F									
										mV _L CDR 2.8
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
CAGTAGCAGTGGTCAAGGAACATGAGATTACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGTGAGGATTGGGTATTACTGTGCTCAAAATCTAGAACTTCCG	S S S G S G T D F T L R I S R V E A E D L G V Y C A Q N L E L P									
										mV _L CDR 3.8
310	320	330								
CTCACGTTGGTGGCTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	L T F G A G T K L E L K									
										mV _L CDR 3.8

FIG. 2G

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTGCAGCTGGGAGTCTGGGGGCTTGGCTGGCAGGCCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGGCCCTGGATTCAATTTCAGTAGCTATGGCA
 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y G

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGTCTGGGTTGCCAGTCTCCAGACAGGAGGCTGGAGTTGGTCCGCAAGTATAACTTTGGTGTAGATAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG
 M S W V R Q S P D R R L E L V A S I N T F G D R T Y P D S V K G R

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAACACCCCTGTACCTGCAAATGACCAAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATTATTACTGTGCAGAGGGACC
 F T I S R D N A K N T L Y L Q M T S L K S E D T A I Y V C A R G T

 310 320 330 340
 GGAACCTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCCTCA
 G T Y W G Q G T T L T V S S

 mV_H CDR 3.13

FIG. 2H

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGCTGACCCAGACTCCACTTCTGGTTAACATTGGACAACCAAGCCTOCATCTCCCTGCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG									
D	V	V	L	T	Q	T	P	L	T
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAAGACATATTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGGCCATAATCTATCTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT									
G	K	T	Y	L	N	W	L	Q	R
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGATCAGGACAGATTACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGAGTTATTATTGCTGGCAAGGGTACACATTTCCT									
T	G	S	G	T	D	F	T	L	K
310	320	330							
CAGACGTTGGTGGAGGCCAACAGCTGGAAATCAA									
Q	T	F	G	G	T	K	L	E	I
313									
mV _L CDR 3.13									

FIG. 2I

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAGGTCCA ACTGGCAGGCTGGCTGA ACTGGCTGGGCTTCAGTGAAGTGTCTGCACCTTCACCCAGCTACTATA									
Q	V	L	Q	S	G	A	E	L	V
M	Y	W	V	K	Q	R	P	G	Q
<hr/>									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGTACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAAGGCCCTGGACTGGATTGGAGGATAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTTCATGAGAAGTCAAGAGCAA									
M	Y	W	V	K	Q	R	P	G	L
E	W	I	G	E	I	N	P	S	N
<hr/>									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCATACTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGTCTATTACTGTACAAGAGGGGT									
A	T	L	T	V	D	K	S	S	S
Y	Y	P	F	D	Y	W	G	Q	G
M	Q	L	S	S	T	A	V	Y	C
A	Y	M	S	S	S	S	D	A	T
<hr/>									
310	320	330	340	350					
TACTACCCCTTTGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCCTCA									
Y	Y	P	F	D	Y	W	G	Q	G
T	T	L	T	V	S	S			
<hr/>									
mV _H CDR 3.16									
mV _H CDR 3.16									
mV _H CDR 2.16									
mV _H CDR 1.16									

FIG. 2J

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTTACTTTCGGTTACCATTTGGGCCAGGCCATCTCTGCAAGTCAGGCCTCTTAGACAGTGATG									
D	V	V	M	T	Q	T	P	L	T
<hr/>									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAAGACATATTGTATGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGGCCATAATCTATCTGGTGTCTGGAGCTCTGGACTCTGGAGGT									
G	K	T	Y	L	Y	W	L	Q	R
<hr/>									
mV _L CDR 1.16									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGGTGGGACAGATTACACTGAAGATCAGCAGACTGGAGGTGAGGATTGGGAGTTATTATTGCTGGCAAGGAAACATTCGG									
T	G	S	G	T	D	F	T	L	K
<hr/>									
310	320	330							
TACAGGTTGGAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA									
Y	T	F	G	G	T	K	L	E	I
<hr/>									
mV _L CDR 3.16									
mV _L CDR 3.16									
<hr/>									
mV _L CDR 1.16									
mV _L CDR 2.16									
mV _L CDR 3.16									

FIG. 2K

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTGCAGCCTCAGGAGTCGGACCTGGCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACATGCACTGTCACTGGCTACTCAATACCACTGATTATG
 D V L Q E S G P G L V K P S L T C T V T G Y S I T S D Y

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CCTGGAATTGGATCGGCAGTTCCAGGAACCAAACTGGAGTGGATGGCTACATAAGCTTCAGTGGTTACACTAGTTACAAACCCATCTCTCAAAAGTCG
 A W N W I R Q F P G N K L E W M G Y I S F S G Y T S Y N P S L K S R

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 AATCTCTGTCACTCGGGACACATCCAGGAACCAATTCTCCAGTTGACTTCTGTGACTACTGAGGACACAGGCCACATATTACTGTGCAAGMAGGTC
 I S V T R D T S R N Q F F L Q L T S V T T E D T A T Y Y C A R E V

310 320 330 340 350 360
 AACTATGGGAACTCCTACCACTTGACTACTGGGCCAAGGCACATTGTCAAGTCTCCTCA
 N Y G D S Y H F D Y W G Q G T I V T V S S

mV_H CDR 3.19

FIG. 2L

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAACTTGGCTCACTCAGTCATCTTCAGCCTTCTTCTCAGCAGGAAACTAACGTGCACTTTGAGTAGTCAACACAGAACGTACACCCATTG									
Q	L	A	L	T	Q	S	S	F	S
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AATGGTATCAGCAACAGTCACTCAAGCCTCCTAAGTATGTGATGGAGGTTAAGAAAGATGGAAGGCCACAGCACAGGTCAATGGATTCTGATCGCTCTC									
E	W	Y	Q	Q	S	L	K	P	K
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
TGATCCAGTTCTGGTGTGATCCGCTACCTCAGCATTCCAACATCCAGCCTGAAGATGAAGCAATATACATCTGTGGTGGGTGATGCAATTAGGGA									
G	S	S	G	A	D	R	Y	L	S
310	320	330	340						
CAATCTGTGTTGGTTGGGGGGGGCAAGGTCACTGTCCCTA									
Q	S	V	F	V	F	G	G	T	V
mV _L CDR 3.19									

FIG. 3A

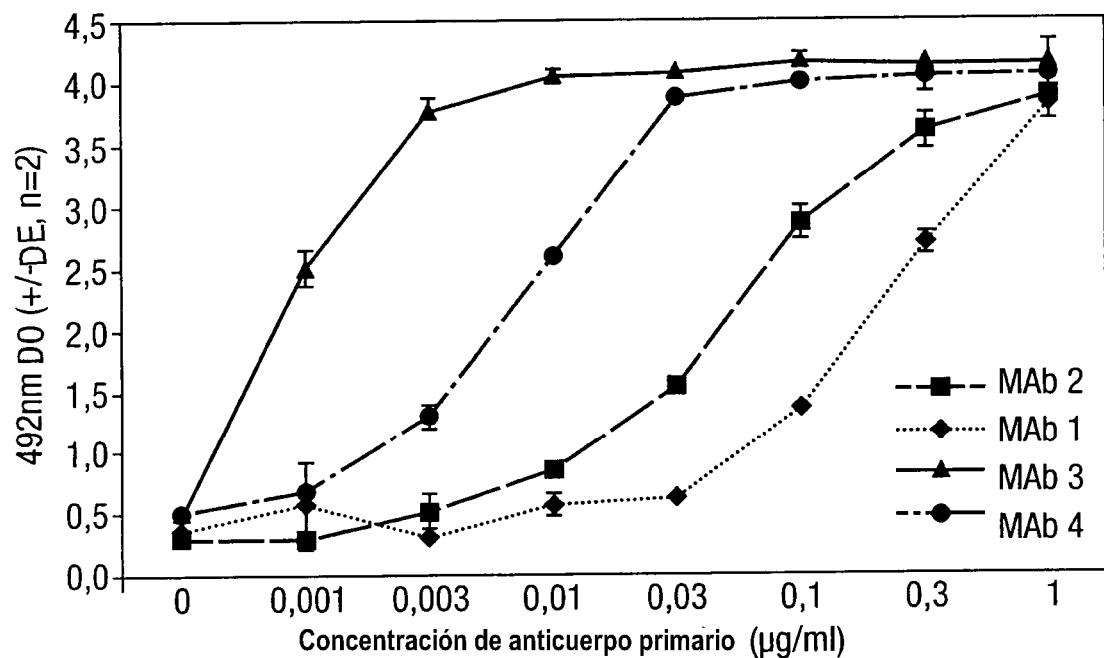


FIG. 3B



FIG. 3C

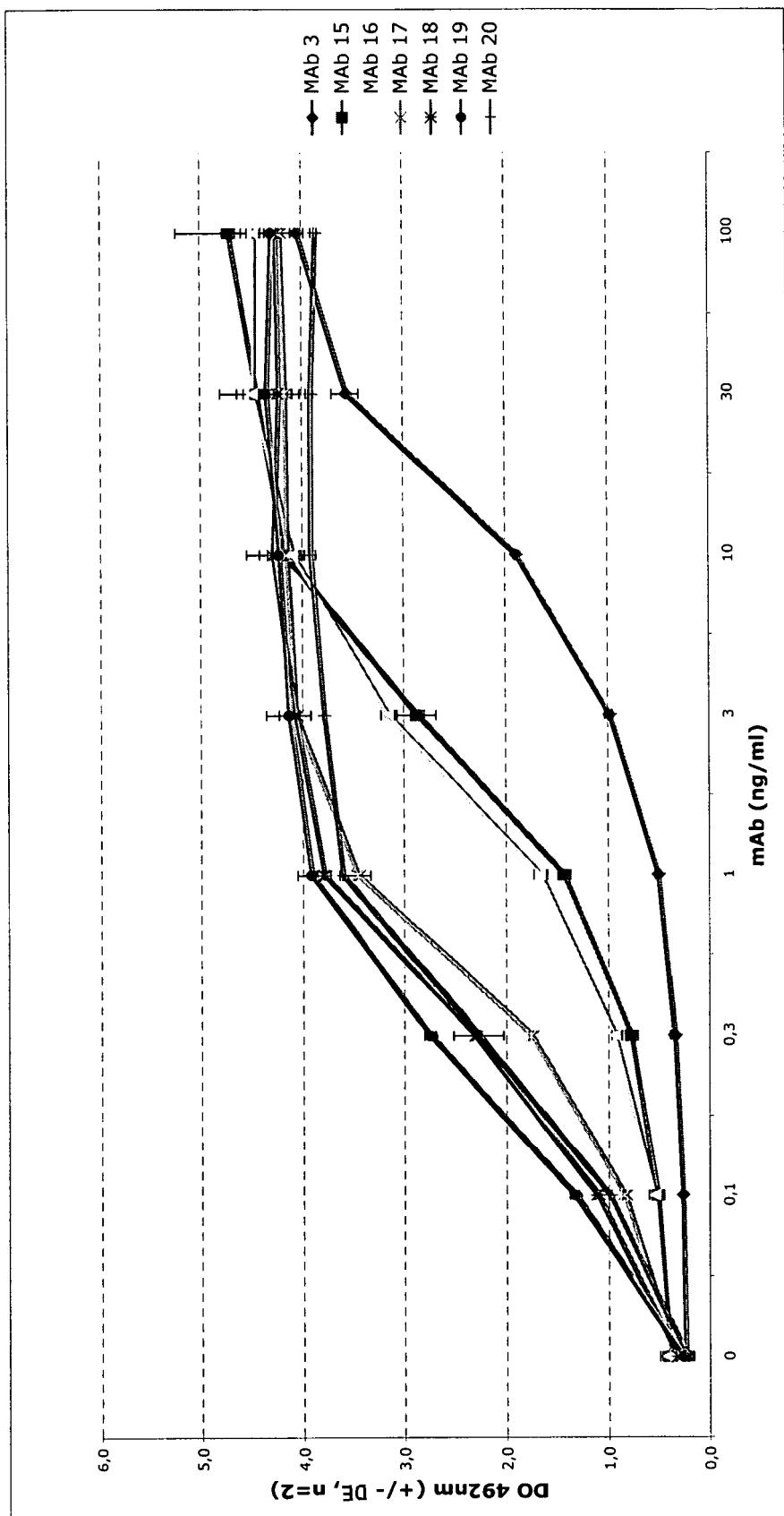


FIG. 4

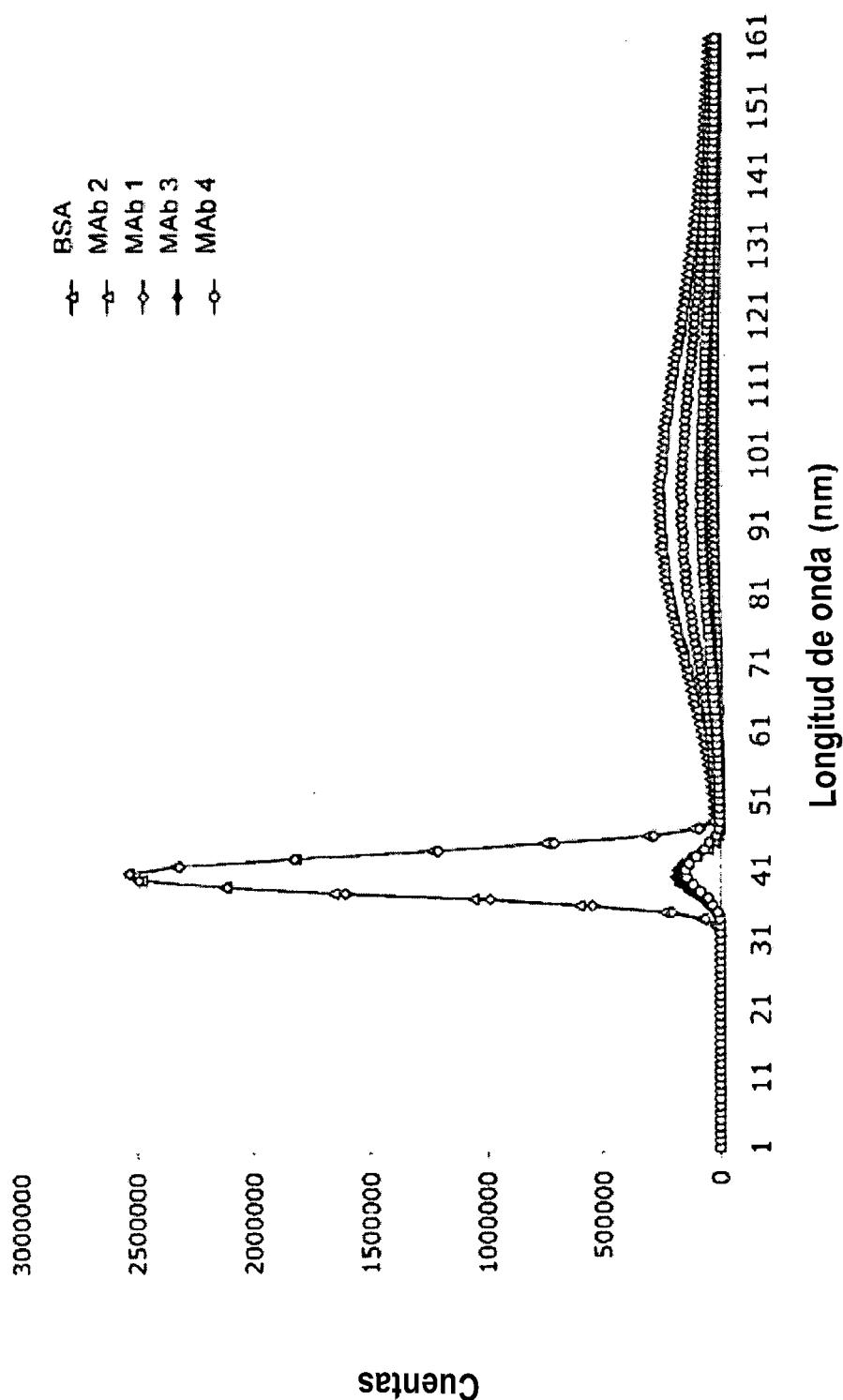


FIG. 5A

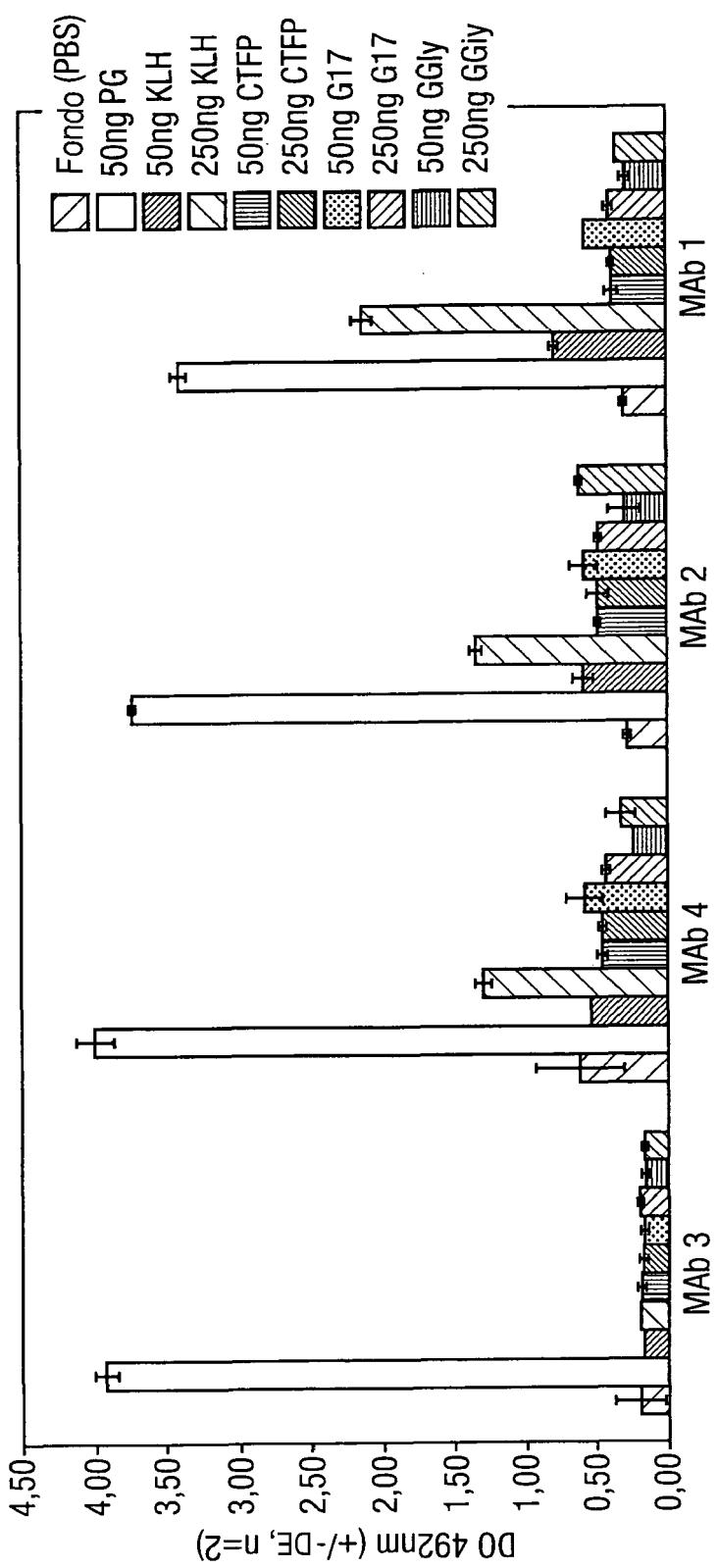


FIG. 5B

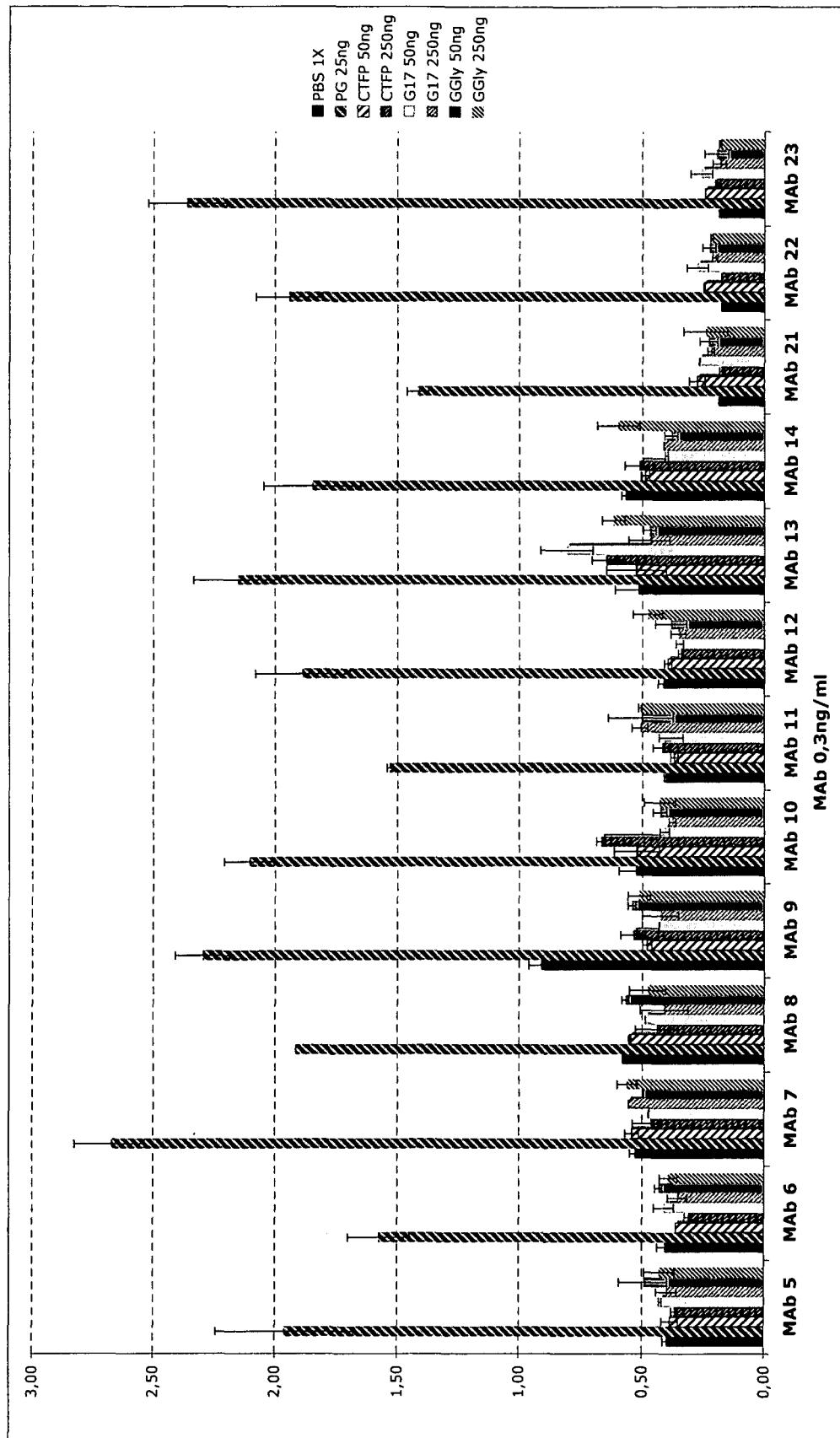


FIG. 5C

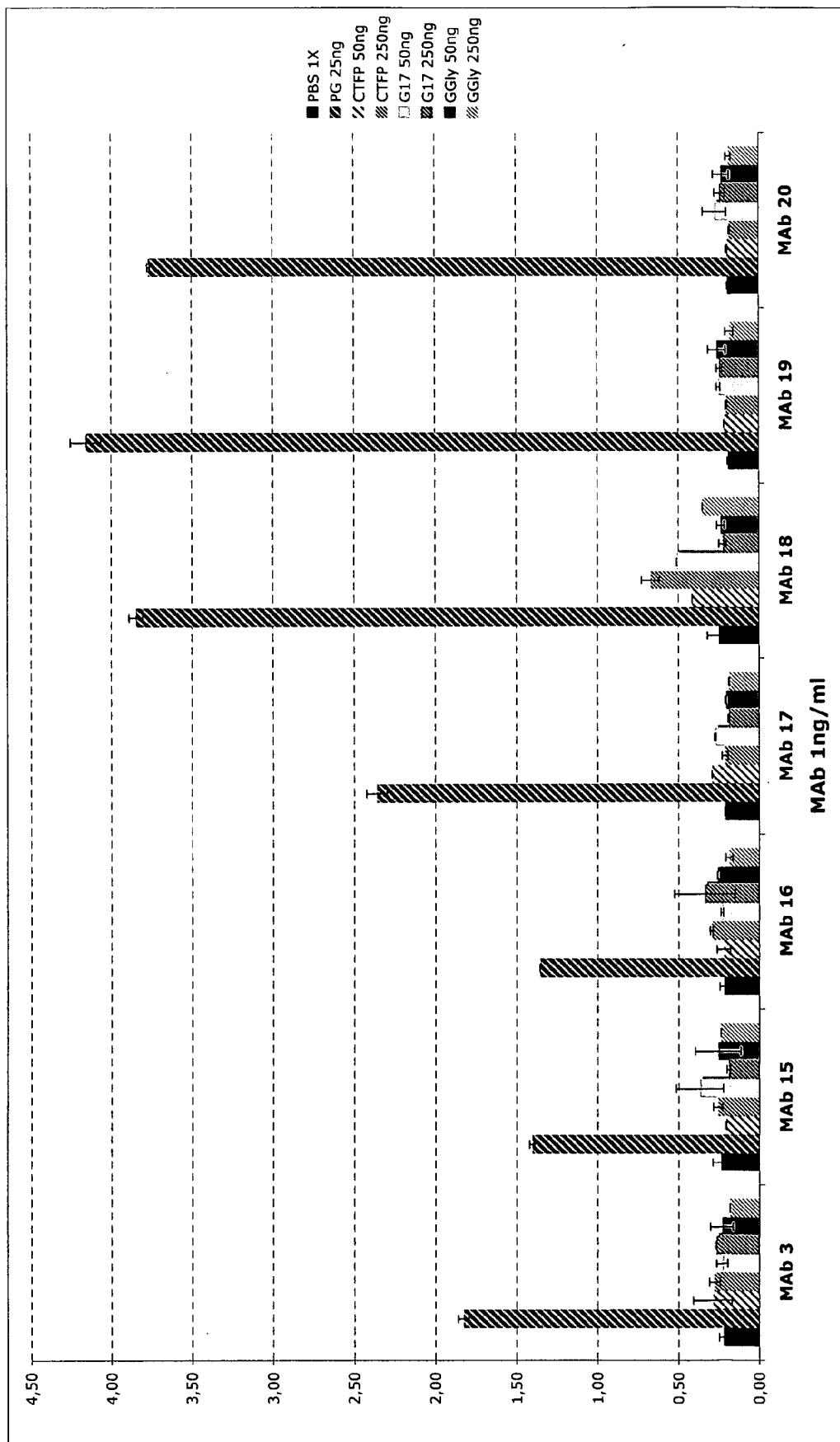


FIG. 6

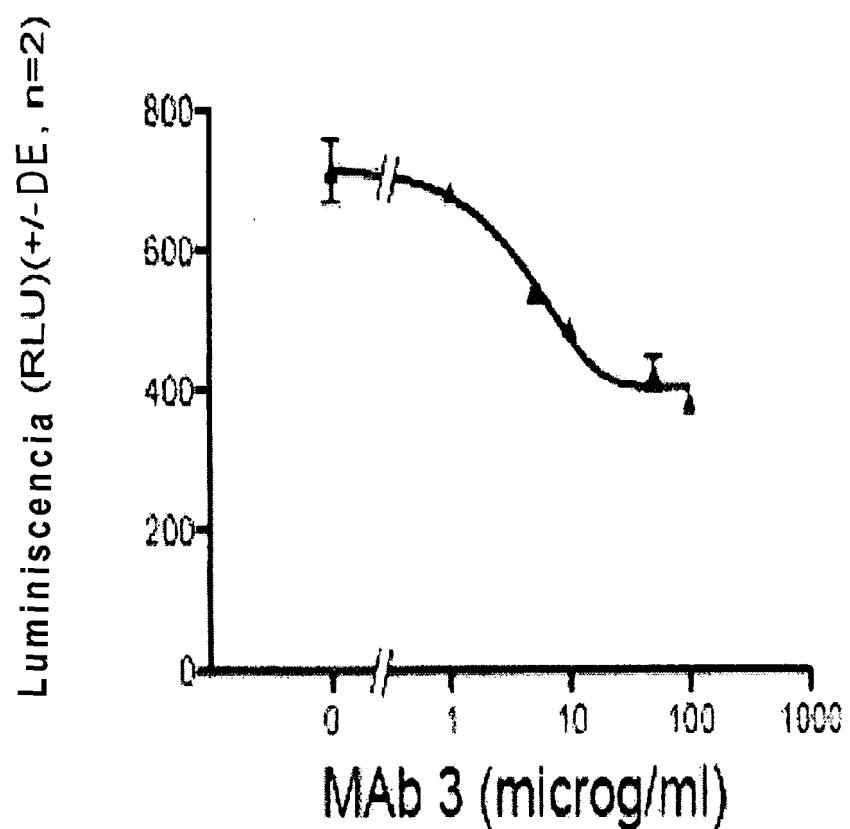


FIG. 7A

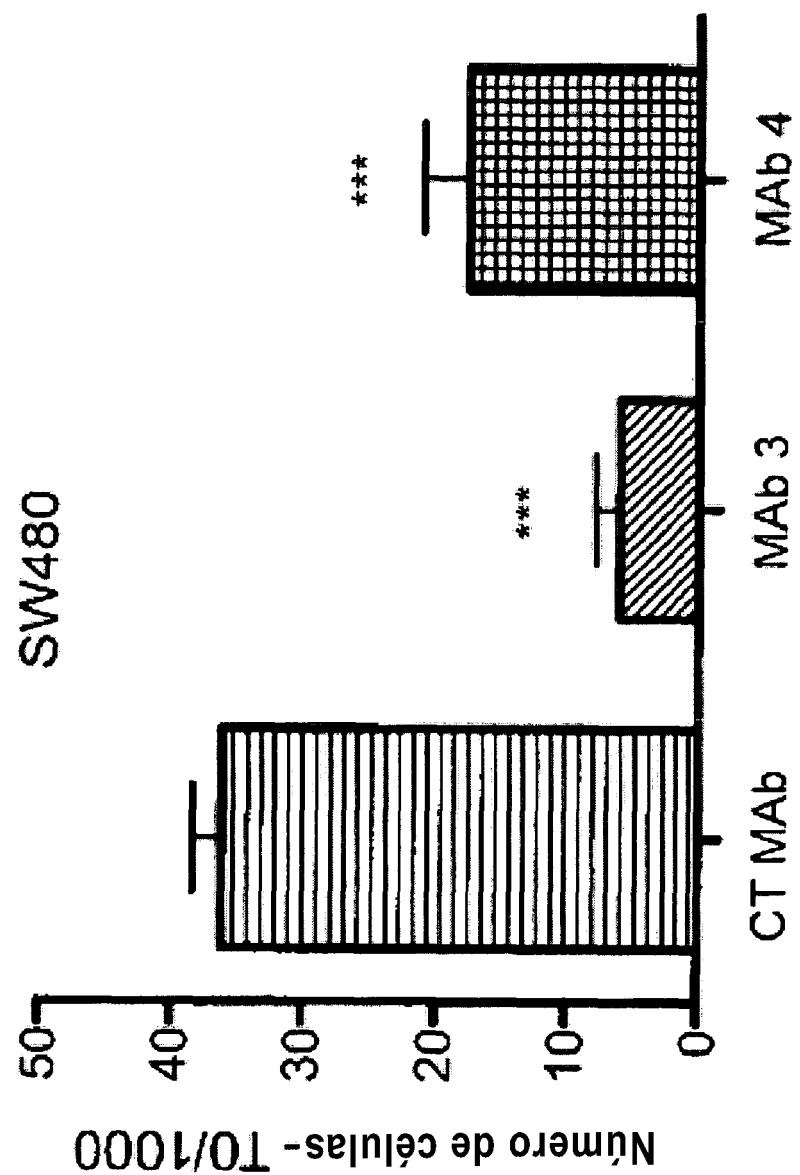


FIG. 7B

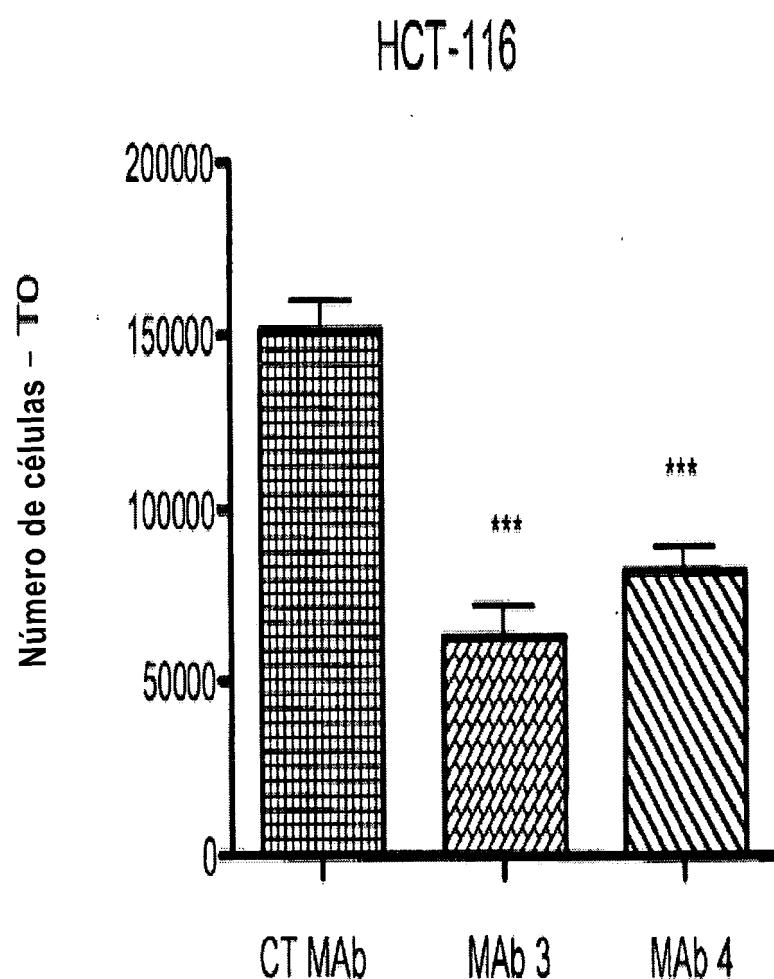


FIG. 7C
LS174T

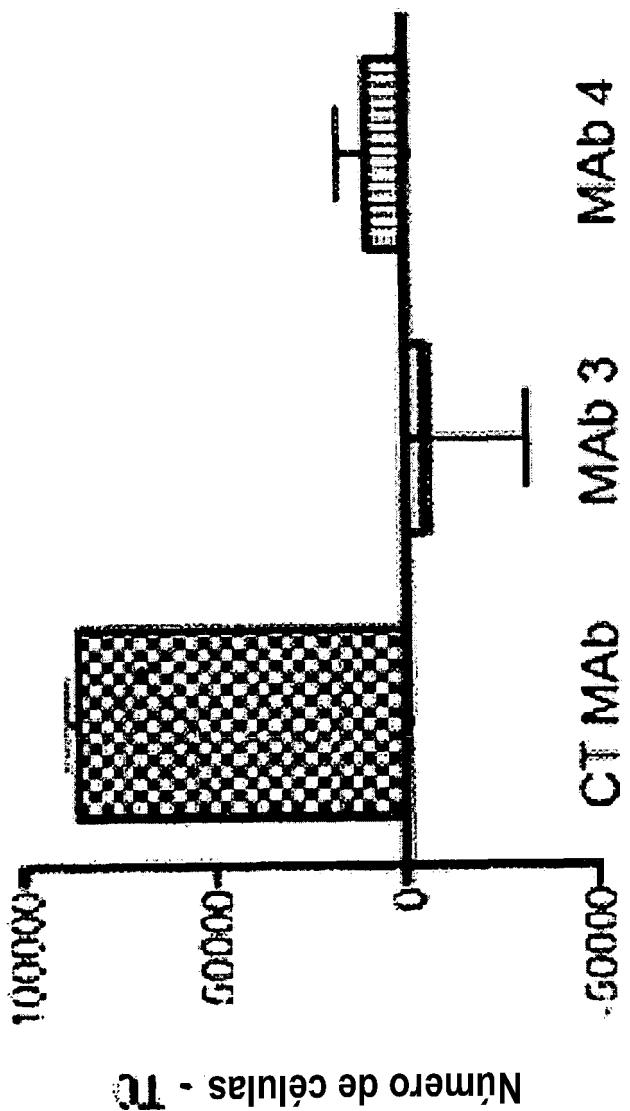


FIG. 7D

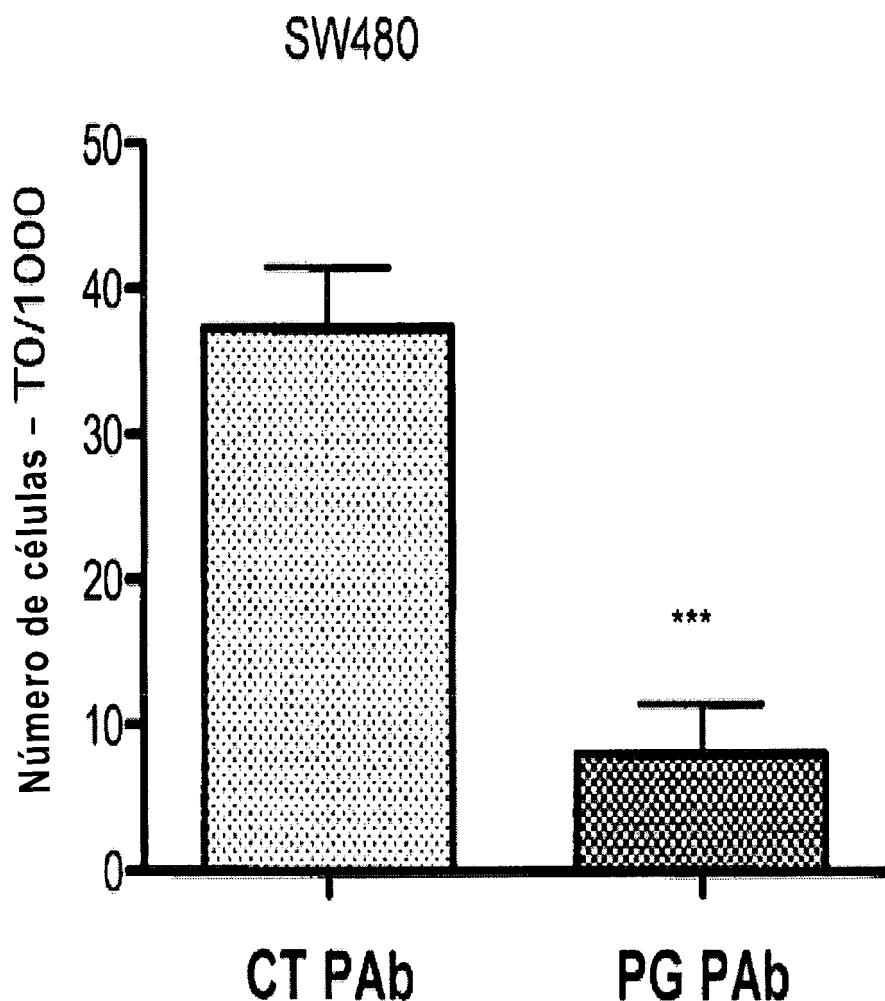


FIG. 7E

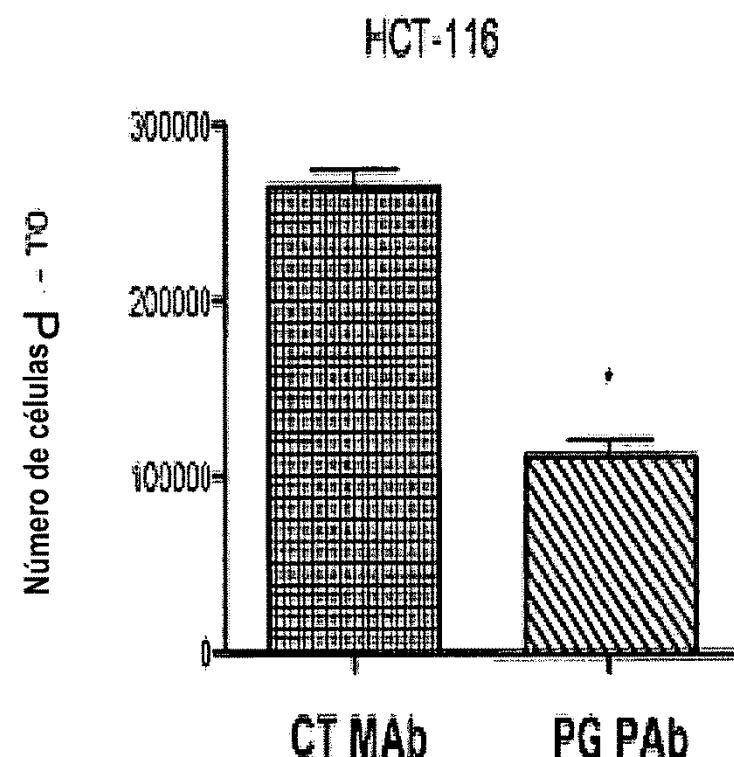


FIG. 7F

LS174T

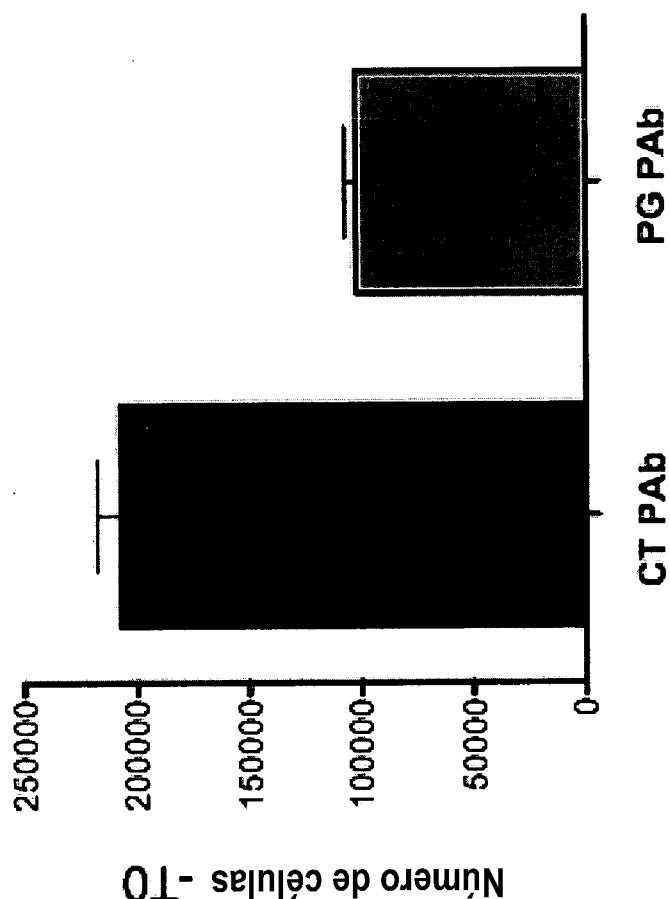


FIG. 7G

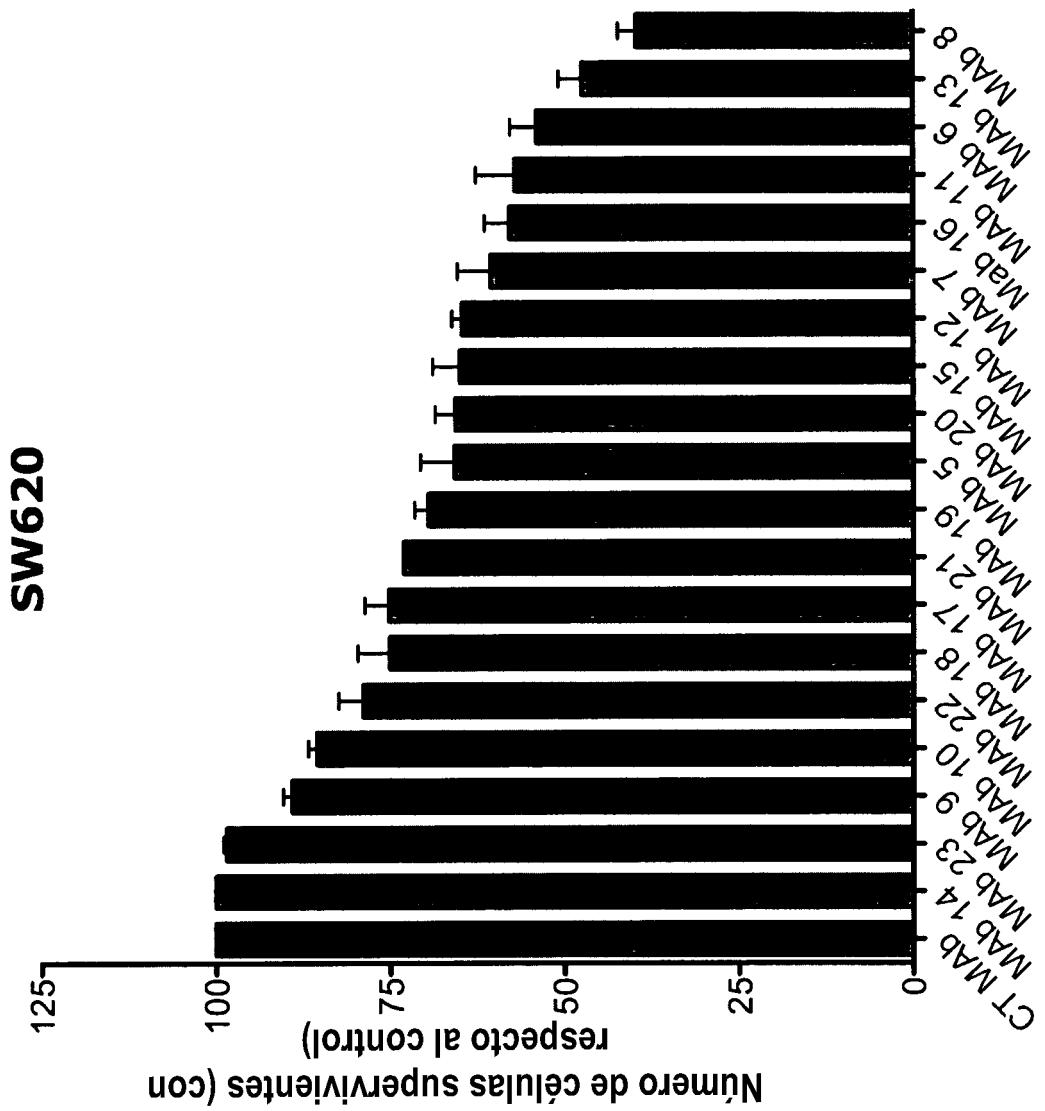


FIG. 7H

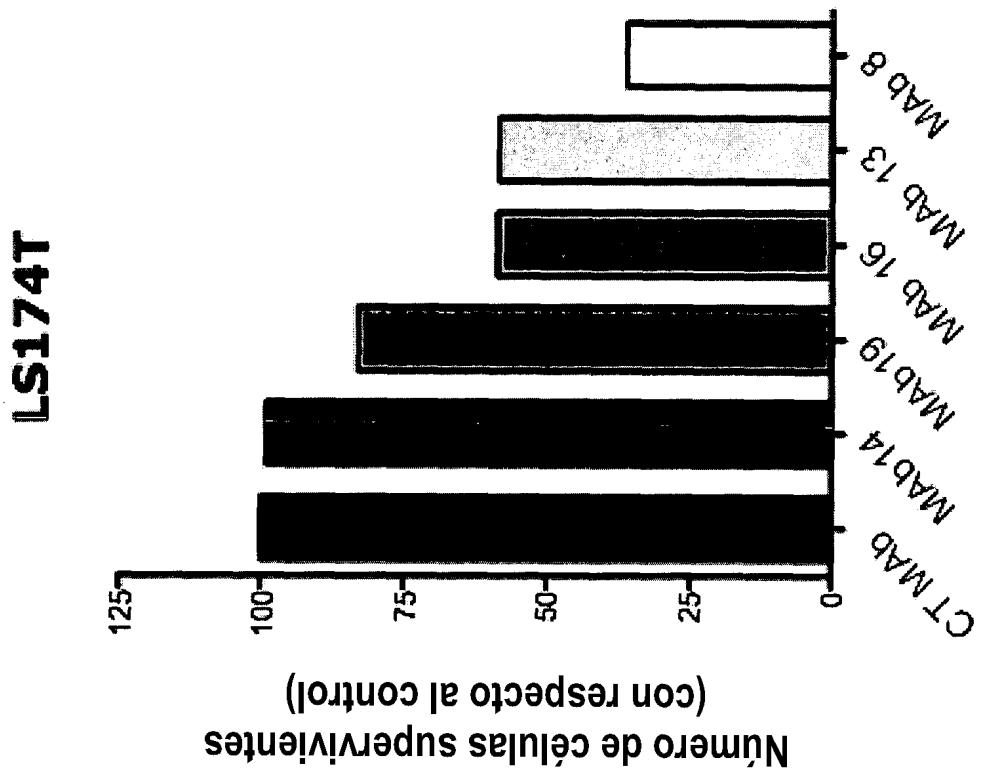


FIG. 71

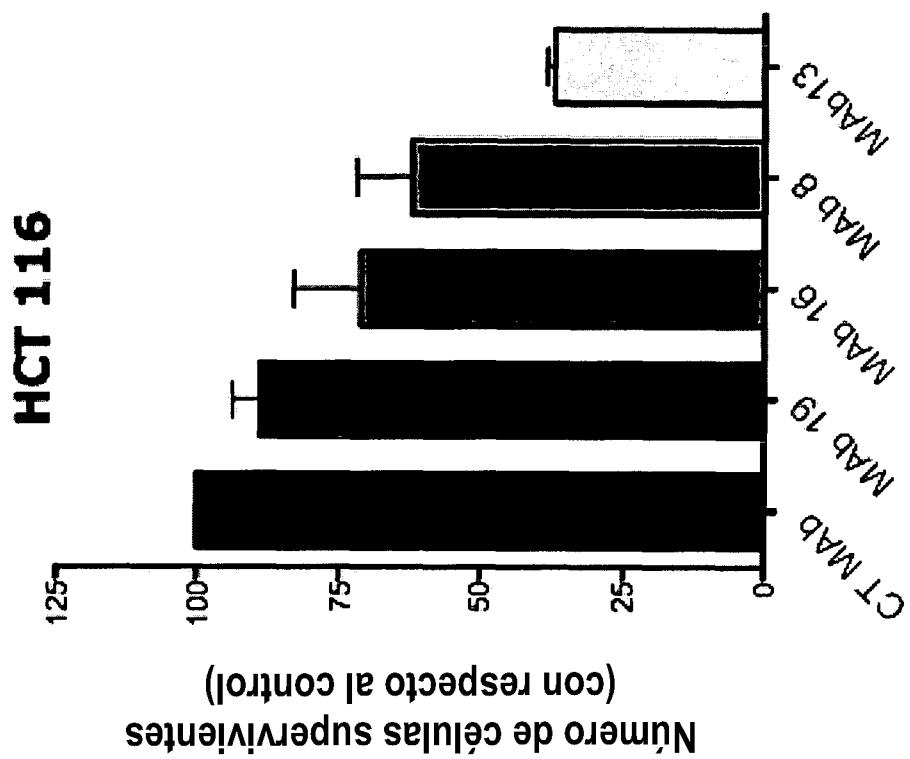


FIG. 8

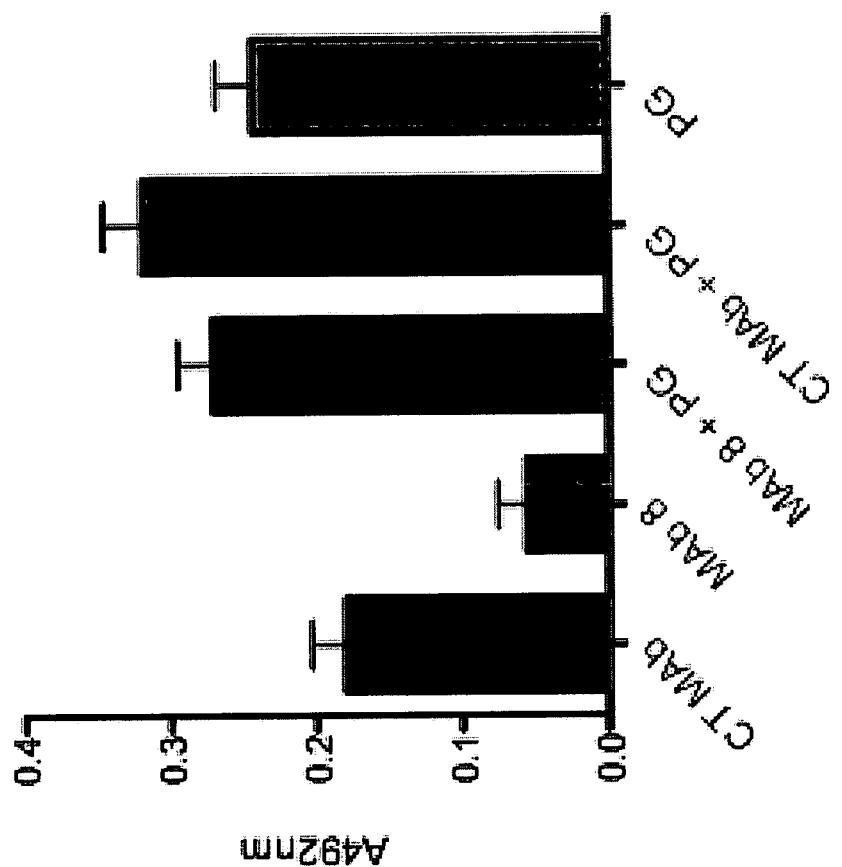


FIG. 9A

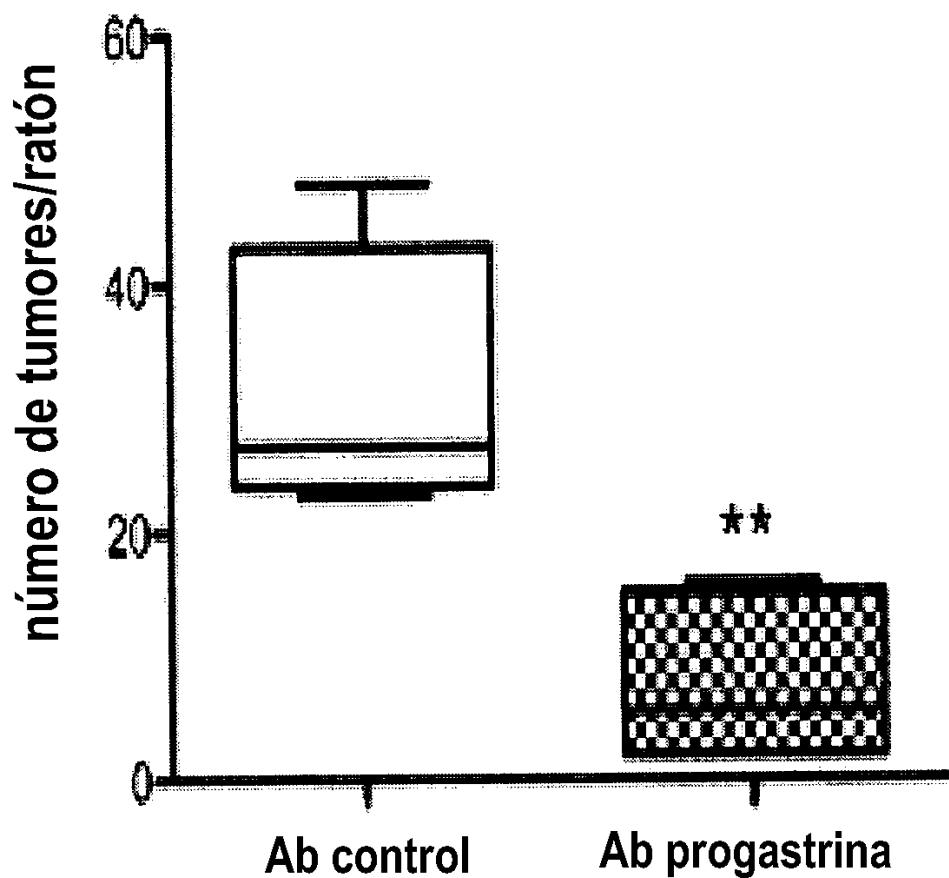


FIG. 9B

