

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C07K 16/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

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

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

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

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

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

30 Prioridad:

16.10.2009 US 252625 P

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

23.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 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.

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*.

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 transcrito 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. 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.

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 CTFP, 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 CTFP), 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 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 embargo, se han descubierto secuencias N- y C-terminales antigénicas 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 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.

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 antigénica ejemplificativa específica que puede usarse para concebir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales corresponde a los residuos 1 a 14 de hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID n°: 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.

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 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: QGPWLEEEEEAYGWMDFG RRS AEDEN (SEC ID n°: 27). Los inmunógenos ejemplificativos que incluyen este antígeno útiles para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG C-terminales se describen en la tabla 1B y en la sección de los Ejemplos.

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 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 técnica o descritas en la presente memoria, tales como por ejemplo, ELISA, calorimetría isotérmica de titulación (ITC), BIAcore, o ensayo de polarización fluorescente.

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 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 MAb14 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 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 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%, 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 epítipo. Como se ejemplifica en la sección de los Ejemplos, tanto los 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.

El mapeo de epítipos revela que los anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales no se unen todos al mismo epítipo, incluso cuando se generan frente al mismo inmunógeno. Lo mismo es cierto para los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales. Los epítipos 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.

En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen a un epítipo 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 epítipo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID n°: 28), residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID n°: 29), residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID n°: 30), residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID n°: 31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID n°: 32).

En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen a un epítipo 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 epítipo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID n°: 33), residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID n°: 34), residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID n°: 35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID n°: 36).

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 epítipos 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 epítipo. 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).

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.

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 epítipo en hPG como se describe en la presente memoria.

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), surrobodyes (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).

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 seres humanos están preferentemente humanizados.

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 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 algunas formas de realización, la célula hospedadora es un hibridoma. También se proporcionan métodos para producir anticuerpos monoclonales anti-hPG cultivando las células hospedadoras.

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 un tumor.

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 dosificación unitaria para facilitar su uso.

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 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.

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

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 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.

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 formas de realización específicas de anticuerpos anti-PG descritas en el párrafo anterior también pueden usarse en este ensayo.

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 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, 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 presente memoria.

4. Breve descripción de las figuras

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.

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 MAb 3 (SEC ID n° 16, 12, 17 y 13, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2A, 2B), anti-hPG MAb 4 (SEC ID n° 18, 14, 19 y 15, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2C, 2D), anti-hPG MAb 8 (SEC ID n° 67, 59, 71 y 63, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2E, 2F), anti-hPG MAb 13 (SEC ID n° 68, 60, 72 y 64, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2G, 2H), anti-hPG MAb 16 (SEC ID n° 69, 61, 73 y 65, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2I, 2J), y anti-hPG MAb 19 (SEC ID n° 70, 62, 74 y 66, respectivamente, en orden de aparición) (figura 2K, 2L), en los que las tres CDR de cada cadena están subrayadas.

Las figuras 3A-C proporcionan gráficos que ilustran las afinidades relativas de unión (medidas como absorbancia a 492 nm) a concentraciones crecientes de anticuerpo (µg/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).

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).

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,

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 n°: 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.

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 n°: 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 n°: 27) acoplado a una secuencia conectora. Ver la tabla 1.

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.

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).

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 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 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 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. 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 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)).

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 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.

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.

Usando antígenos de las regiones N- o C-terminales de hPG, pueden generarse anticuerpos que reconozcan diferentes epítomos de hPG. El epítomo 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 epítomos revela que anti-hPG MAb 2 y MAb 4 se unen al mismo epítomo; anti-hPG MAb 1 y MAb 3 se unen aproximadamente al mismo epítomo; MAb 17, MAb 18, MAb 19, y MAb 20 se unen aproximadamente al mismo epítomo; MAb 15 y MAb 16 se unen aproximadamente al mismo epítomo; anti-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb 9, y MAb 12 se unen al mismo epítomo y se unen aproximadamente al mismo epítomo que anti-hPG MAb 10; y anti-hPG MAb 11 y MAb 14 se unen aproximadamente al mismo epítomo.

Si un anticuerpo monoclonal anti-hPG reconoce o no un epítomo particular puede determinarse usando un ensayo de competición como se describe en la presente memoria, en el que se conoce el epítomo unido por el anticuerpo de referencia. En algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal anti-hPG compete con un anticuerpo de referencia que se une a un epítomo 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 epítomo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID n°: 28), residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID n°: 29), residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID n°: 30), residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID n°: 31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID n°: 32). En algunas formas de realización, el anticuerpo monoclonal anti-hPG compete con un anticuerpo de referencia que se une a un epítomo 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 epítomo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID n°: 33), residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID n°: 34), residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID n°: 35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID n°: 36).

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 µg/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 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 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.

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 QSIHVSNGNTY ("V_L CDR 1.3"; SEC ID n°: 4), QSLVHSSGVITY ("V_L CDR 1.4"; SEC ID n°: 10), QSLDSDGKTY ("V_L CDR 1.16"; SEC ID n°: 50), y SQHRTYT ("V_L CDR 1.19"; SEC ID n°: 51); V_L CDR2 se selecciona de entre KVS ("V_L CDR 2.3" y ("V_L CDR 2.4"; SEC ID n°: 5), LVS ("V_L CDR 2.16"; SEC ID n°: 53), y VKKDGS ("V_L CDR 2.19"; SEC ID n°: 54); V_L CDR3 se selecciona de entre FQGSHVPFT ("V_L CDR 3.3"; SEC ID n°: 6), SQSTHVPPT ("V_L CDR 3.4"; SEC ID n°: 11), WQGTHTSPYT ("V_L CDR 3.16"; SEC ID n°: 57), y GVGDAIKQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEC ID n°: 58); V_H CDR1 se selecciona de entre GYFTSYW ("V_H CDR 1.3"; SEC ID n°: 1), GYTFSSW ("V_H CDR 1.4"; SEC ID n°: 7), GYFTSY ("V_H CDR 1.16"; SEC ID n°: 39), y GYSITSDYA ("V_H CDR 1.19"; SEC ID n°: 40); V_H CDR2 se selecciona de entre FYPGNSDS ("V_H CDR 2.3"; SEC ID n°: 2), FLPGSGST ("V_H CDR 2.4"; SEC ID n°: 8), INPSNGGT ("V_H CDR 2.16"; SEC ID n°: 43), y ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEC ID n°: 44); y V_H CDR3 se selecciona de entre TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEC ID n°: 3), ATDGNYDWFAY ("V_H CDR 3.4" SEC ID n°: 9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEC ID n°: 47), y AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEC ID n°: 48). Ver la tabla 1A.

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 n°: 49) y QSLDSDGKTY ("V_L CDR 1.13"; SEC ID n°: 50); V_L CDR2 se selecciona de entre QMS ("V_L CDR 2.8"; SEC ID n°: 52) y LVS ("V_L CDR 2.13"; SEC ID n°: 53); V_L CDR3 se selecciona de entre AQNLPLT ("V_L CDR 3.8"; SEC ID n°: 55) y WQGTHTFPQT ("V_L CDR 3.13"; SEC ID n°: 56); V_H CDR1 se selecciona de entre GYFTSY ("V_H CDR 1.8"; SEC ID n°: 37) y GYFTSY ("V_H CDR 1.13"; SEC ID n°: 38); V_H CDR2 se selecciona de entre ISSGGTYT ("V_H CDR 2.8"; SEC ID n°: 41) y INTFGDRT ("V_H CDR 2.13"; SEC ID n°: 42); y V_H CDR3 se selecciona de entre ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEC ID n°: 45) y ARGTY ("V_H CDR 3.13"; SEC ID n°: 46). Ver la tabla 1B.

Tabla 1A

Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales									
Inmunógeno	Híbrido (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	GYFTSY W	(SEC ID n° 1)	mV _H 3	(SEC ID n° 12)	hV _H 3	(SEC ID n°: 21)
			V _H CDR 2.3	FYPGNSD S	(SEC ID n° 2)				
			V _H CDR 3.3	TRRDSP QY	(SEC ID n° 3)				
			V _L CDR 1.3	QSIHVSNGNTY	(SEC ID n° 4)	mV _L 3	(SEC ID n° 13)	hV _L 3	(SEC ID n°: 22)
			V _L CDR 2.3	KVS	(SEC ID n° 5)				
			V _L CDR 3.3	FQGSHV PFT	(SEC ID n° 6)				
N2	20D2C3G 2	MAb4	V _H CDR 1.4	GYTFSSS W	(SEC ID n° 7)	mV _H 4	(SEC ID n° 14)	hV _H 4	(SEC ID n°: 23)
			V _H CDR 2.4	FLPGSGS T	(SEC ID n° 8)				
			V _H CDR 3.4	ATDGNY DWFAY	(SEC ID n° 9)				
			V _L CDR 1.4	QSLVHSS GVTY	(SEC ID n° 10)	mV _L 4	(SEC ID n° 15)	hV _L 4	(SEC ID n°: 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	QSLDSD 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	ATQGNYSLDF	(SEC ID nº 45)			hV _H 8c	(SEC ID nº 79)
			V _L CDR 1.8	KSLRHTKGITF	(SEC ID nº 49)	mV _L .8	(SEC ID nº 63)	hV _L 8a	(SEC ID nº 76)
			V _L CDR 2.8	QMS	(SEC ID nº 52)			hV _L 8b	(SEC ID nº 78)
			V _L CDR 3.8	AQNLELPLT	(SEC ID nº 55)			hV _L 8c	(SEC ID nº 76)
C1	1D8F5B3	MAb9							
C1	1E1C7B4	MAb10							
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11							
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12							
C1	2C6C3C7	MAb13	V _H CDR 1.13	GFIFSSYG	(SEC ID nº 38)	mV _H .13	(SEC ID nº 60)	hV _H .1 3a	(SEC ID nº 80)
			V _H CDR 2.13	INTFGDRT	(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	QSL LDS 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	WQGTHFPQT	(SEC ID nº 56)				
C1	2H9F4B7	MAb14							
C2	1F11F5E10	MAb21							
C2	1F11F5G9	MAb22							
C2	1A11F2C9	MAb23							
Inmunógeno C1 = KLH Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, también representado como KLH Cys Ahx Ahx (SEC ID nº 27)									
Inmunógeno C2 = DT Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, también representado como DT Cys Ahx Ahx (SEC ID nº 27)									

En la Tabla 1B, todas las secuencias de aminoácidos 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_HCDR1.3, V_HCDR2.3 y V_HCDR3.3. 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_LCDR1.3, V_LCDR2.3 y V_LCDR3.3. 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_HCDR1.4, V_HCDR2.4 y V_HCDR3.4. 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 $mV_L.4$ (SEC ID n°: 15). Ver la figura 2D.

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 $mV_H.8$ (SEC ID n°: 59). Ver la figura 2E.

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 $mV_L.8$ (SEC ID n°: 63). Ver la figura 2F.

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 $mV_H.13$ (SEC ID n°: 60). Ver la figura 2G.

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 $mV_L.13$ (SEC ID n°: 64). Ver la figura 2H.

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 $mV_H.16$ (SEC ID n°: 61). Ver la figura 2I.

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 $mV_L.16$ (SEC ID n°: 65). Ver la figura 2J.

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. En una forma de realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a $mV_H.19$ (SEC ID n°: 62). Ver la figura 2K.

En algunas formas de realización, las CDR de la cadena V_L 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 a $mV_L.19$ (SEC ID n°: 66). Ver la figura 2L.

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 $mV_H.3$ (SEC ID n°: 12) y la cadena V_L tiene una secuencia correspondiente a $mV_L.3$ (SEC ID n°: 13).

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 $mV_H.4$ (SEC ID n°: 14) y una cadena V_L tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.4$ (SEC ID n°: 15).

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 $mV_H.8$ (SEC ID n°: 59) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.8$ (SEC ID n°: 63).

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 $mV_H.13$ (SEC ID n°: 60) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.13$ (SEC ID n°: 64).

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 $mV_H.16$ (SEC ID n°: 61) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.16$ (SEC ID n°: 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 MAb 19 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_H .19 (SEC ID n°: 62) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_L .19 (SEC ID n°: 66).

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 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.

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 que las tres CDR de cada dominio variable interactúan 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 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 polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los 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).

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 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.

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 n° 5.807.715; n° 4.816.567; y n° 4.816.397.

Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden ser humanizados. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, 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 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 n° 5.530.101; n° 5.585.089; n° 5.693.761; n° 5.693.762; y n° 6.180.370 de Queen *et al.*; documento EP 239 400; publicación PCT WO 91/09967; patente US n° 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 n° 5.565.332.

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 V_L CDR y cualquiera de tres V_H CDR descritas en la presente memoria; (2) una región

variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 21 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 22; (3) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 24; (4) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID n°: 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 n°: 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 n°: 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 n°: 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 n°: 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 n°: 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 n°: 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 n°: 91, 93, y 95.

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 n° 5.658.570; n° 5.681.722; y n° 5.693.780.

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 n°: 12 (mVH.3) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 13 (mVL.3); y anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 14 (mVH.4) y la cadena VL tiene una secuencia correspondiente a SEC ID n°: 15 (mVL.4), anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 59 (mVH.8) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 63 (mVL.8); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 60 (mVH.13) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 64 (mVL.13); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 61 (mVH.16) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 65 (mVL.16); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 62 (mVH.19) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID n°: 66 (mVL.19) o cualquier combinación de cadenas VH y VL divulgadas en la presente memoria.

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 epítipo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID n°: 28), residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID n°: 29), residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID n°: 30), residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID n°: 31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID n°: 32); y anticuerpos que se unen a un epítipo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID n°: 33), residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID n°: 34), residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID n°: 35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID n°: 36).

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 epítipo 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). Después 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 incuban 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 incuban durante 1 hora a 22°C. Después 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 epítipo 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 anticuerpos de ensayo no marcados con células que expresan la progastina 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 epítipo.

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

$$K_i = CI_{50} / (1 + [\text{Concentración de Ab de referencia}] / K_d)$$

En la que CI_{50} 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 K_d es la constante de disociación del anticuerpo de referencia, una medida de su afinidad por la progastina. Los anticuerpos que compiten con los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria pueden tener una K_i de 10 pM a 10 nM bajo las 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).

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) se incuba con una cantidad conocida de progastina. El anticuerpo de ensayo no marcado se añade al complejo preunido de progastina 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 epítipo superpuesto, la intensidad disminuirá respecto a la unión del anticuerpo control marcado en ausencia del anticuerpo de ensayo.

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) 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 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.

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 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 maleimidias 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 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 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.

Los anticuerpos monoclonales anti-hPG incluyen anticuerpos marcados, útiles en aplicaciones de diagnóstico. 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 "marcage." Un marcage puede conjugarse directamente o indirectamente con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción. El marcage puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcajes con radioisótopos, marcajes isotópicos, o marcajes fluorescentes) o, en el caso de un marcage 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 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 marcajes enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente US nº 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas 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 umbeliferona, 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 aecuatorina, 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 .

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

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.

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 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.

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).

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.

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 IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA , IgE , IgM o IgD , pero en determinadas formas de realización es una región constante de IgG_1 o IgG_4 . 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.

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 $(Gly_4-Ser)_3$ (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).

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.

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).

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.*

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⁻ 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 transfectan 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 procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares.

Es posible expresar los anticuerpos de la descripción en células hospedadoras procariontas 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 ejemplificativas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO DHFR⁻, 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.

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.

Para la expresión recombinante de un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción, la célula hospedadora puede cotransfectarse 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.

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, 2ª 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).

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.

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).

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.

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.

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).

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.

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).

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.

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 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 cadena ligera que comprende SEC ID nº: 63. 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: 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.

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 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.

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 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

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 progesterona, 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 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.

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.

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.

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.

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

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).

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 del sujeto. El anticuerpo puede formularse como una disolución acuosa y administrarse por inyección subcutánea.

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 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.

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, isotonicadores, 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.

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.

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 isotonicantes conocidos algunas veces como “estabilizadores” pueden añadirse para asegurar la 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, arabitol, 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 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, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitoles tales como inositol, polietilenglicol; polímeros de aminoácidos, agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tioctico, 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 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.

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.

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.

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:

- 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.

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

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.

- 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 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.
- 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 progastina 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 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.
- 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.
- 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.
- La cantidad, frecuencia y duración de la administración dependerán de una variedad de factores, tales como la edad, peso y afección patológica del paciente. Un régimen terapéutico para la administración puede continuar durante 2 semanas hasta indefinidamente, durante 2 semanas hasta 6 meses, de 3 meses a 5 años, de 6 meses a 1 o 2 años, de 8 meses a 18 meses, o similares. Opcionalmente, el régimen terapéutico proporciona una administración repetida, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, cada dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas, o un mes. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. La administración puede repetirse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-hPG puede administrarse como una dosis única o durante el curso de un régimen terapéutico, por ejemplo, durante el curso de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, un año o más.

Métodos terapéuticos

- 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.
- 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.
- 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 resecionado 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.

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.

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

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.

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 puede preceder o seguir a la administración del segundo agente terapéutico.

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.

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.

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-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleuquina, agentes alquilantes, alopurinol sodio, alitretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC)), agentes antimetabólicos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), diamino dicloro platino, antraciclina, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG vivo (intravesical), fosfato de betametasona sodio y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfán, calcio leucovorina, 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), daunirubicina HCL, daunorubicina citrato, denileuquina difitox, dexrazoxano, dibromomanitol, dihidroxi antracina diona, docetaxel, dolasetrón mesilato, doxorubicina 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 citrororurum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, gemcitabina HCL, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, granisetron HCL, hidroxiurea, idarubicina HCL, ifosfamida, interferón α -2b, irinotecán HCL, letrozol, leucovorina calcio, acetato de leuprolida, levamisol HCL, lidocaína, lomustina, maitansinoide, mecloretamina HCL, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán HCL, mercaptopurina, 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, procarbazona HCL, propranolol, rituximab, sargramostim, 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; irinotecán en combinación con capecitabina, mitomicina C en combinación con 5FU, irinotecán 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.

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 una a un epítipo 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 una 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 policlonal anti-hPG C-terminal de conejo y se incuban 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 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.

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). Desde una perspectiva histológica, los tumores colorrectales presentan un amplio espectro de neoplasmas, 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, con potencial maligno creciente: tubular, tubulovelloso y vellosos. Los adenocarcinomas también se han categorizado según su histología en adenocarcinoma mucinoso (coloide); adenocarcinoma en anillo de sello; tumores escirro; y neuroendocrino.

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.

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.

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 policlonal 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.

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 comunicarlás al usuario final. Dichos medios incluyen de manera no limitativa medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios
10 ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan dichos materiales de instrucción.

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
30 gastrina, se usaron con éxito para generar anticuerpos monoclonales que eran específicos para hPG. La tabla siguiente resume los inmunógenos ensayados.

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), 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
40 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
55 timidina (medio HAT).

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.

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.

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-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.

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).

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.

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.

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.

El crecimiento de las células de hibridoma a través de múltiples ciclos de cultivo seriado se evaluó por observación microscópica dos días después de la siembra. Se espera que las células proliferen y llenen el pocillo unas 48 horas después de la siembra. Se realizó la dilución seriada (típicamente, una primera dilución a 1:5, seguido de por lo menos 2 diluciones más a 1:10), seguido de observación microscópica a las 48 horas para confirmar un crecimiento adecuado. Las células de los hibridomas que cumplen este criterio se diluyeron y sembraron de nuevo, para observarse con el microscopio 48 horas más tarde. Dichos ciclos de "dilución-siembra-observación" se repitieron 3 veces antes de que clasificar un hibridoma como que cumple los criterios de "crecimiento".

La secreción de anticuerpos se ensayó realizando ELISA usando hPG como se ha descrito anteriormente en diluciones seriadas (1/2, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000) de los sobrenadantes sin células.

La monoclonalidad se determinó sembrando un clon o hibridoma en una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,6 células/pocillo e incubando durante dos semanas. A las dos semanas, los sobrenadantes se ensayaron para unión a hPG por ELISA y la naturaleza clonal de la población se determinó tomando como base presentar un valor DO consistente en por lo menos el 90% de los pocillos que contienen células vivas.

Anticuerpos monoclonales frente a progastrina de longitud completa

Cada uno de tres ratones se inoculó con progastrina humana recombinante (descrito anteriormente). El inmunógeno no indujo ninguna respuesta inmunitaria detectable en los ratones: no pudo detectarse ninguna unión a PG usando un ELISA como se ha descrito anteriormente. No se realizaron fusiones.

Anticuerpos monoclonales N-terminales frente a la progastrina

Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos monoclonales N-terminales se generaron frente a un antígeno que contiene los residuos 1 a 14 de hPG unido a albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa (KLH) mediante un conector Ahx-Cys en el extremo C-terminal del antígeno de 14 residuos (SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys (SEC ID n°: 26)).

En un primer experimento, tres ratones se inocularon con un péptido N-terminal unido a BSA. De las tres fusiones, realizadas con esplenocitos de dos de los tres ratones, una fusión no proporciona clones que mostraran unión a PG o al inmunógeno. De las otras dos fusiones sembradas en placas de 96 pocillos, una generó 4 hibridomas que se unen a PG y específicos de PG, de los cuales se recuperó un único subclón estable que produce IgG. La segunda fusión también resultó en un subclón de hibridoma único estable que produce IgG1, unión a PG y específico para PG. Globalmente, de los tres ratones, 17 hibridomas en el primer ciclo, o 0,74% de los hibridomas cribados) fueron positivos para unión a PG e inmunógeno, de los cuales se subclonaron 9 estirpes celulares positivas, de las cuales dos fueron estirpes celulares positivas, que producen IgG. Así, el primer experimento generó dos clones después de un par de ciclos de subclonación que retuvieron una señal positiva fuerte frente al inmunógeno y hPG (positivo para "unión a PG") y no se unieron a otros péptidos derivados del gen de la gastrina (positivo para "específico para PG"): los hibridomas 43B9G11 y WE5H2G7, que producen anti-hPG MAb1 y anti-hPG MAb 2, respectivamente.

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. 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 isotipo IgG1.

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 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).

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.

Tabla 3

Expt	Inmunógeno	Clones sembrados	Sobrenadantes de hibridoma PG ⁺	Clones específicos de PG	Subclones específicos para PG, que producen IgG
1	(SEC ID n°: 26)-Ahx-Cys-BSA	2304	17 (0,74%)	9 (0,39%)	2 (0,087%)
2	(SEC ID n°: 26)-Ahx-Cys-KLH	1920	124 (6,5%)	12 (0,6%)	2 (0,1%)
3	(SEC ID n°: 26)-Ahx-Cys-KLH	7680	220 (2,9%)	12 (0,15%)	6 (0,1%)

Anticuerpos monoclonales C-terminales frente a progastrina

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-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEC ID n°: 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 n°: 97), conjugado bien con BSA o KLH, fracasaron en la generación de clones.

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 n°: 97, unido a BSA. Ninguna de las fusiones generó ningún hibridoma que produce IgG. En un segundo experimento, se inyectó a 6 ratones, 3 a cada uno, un péptido correspondiente a SEC ID n°: 97, unido a KLH en su extremo N-terminal, o un péptido correspondiente a SEC ID n°: 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.

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 n°: 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 hibridomas a partir de una fusión por ratón. Globalmente, de los 7680 hibridomas 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), 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).

La tabla siguiente muestra el número de clones sembrados para cada experimento, el inmunógeno usado, el número de hibridomas cribado, el número y porcentaje de hibridomas 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.

Tabla 4

Expt	Inmunógeno	Clones sembrados	Sobrenadantes de hibridoma PG ⁺	Clones específicos para PG	Subclones específicos para PG, que producen IgG
1	BSA-conector-(SEC ID n°: 97)	3072	10 (0,32%)	9 (0,29%)	0
2	KLH- conector-(SEC ID n°: 97) (SEC ID n°: 97)-conector-KLH	1920	27 (0,47%) 0	4 (0,07%) 0	0 0
3	KLH-conector-(SEC ID n°: 96) DT-conector-(SEC ID n°: 96)	3840 3840	192 (5%) 190 (4,95%)	17 (0,44%) 13 (0,34%)	10 (0,26%) 3 (0,08%)

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

Tabla 5

Anticuerpo monoclonal	Hibridoma	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

Las estirpes celulares de hibridoma 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 Microorganismes (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 reactivo 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 usando procedimientos estándar. Ver la figura 2A-B (MAb 3), figura 2C-D (MAb 4).

20 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 n° 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 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
25 cebadores degenerados para las secuencias señal murinas 5' y cebadores para las regiones constantes 3' para cada una de IgGVH, IgkVL e IgλVL. (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
30 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 pocillos 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 µg/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

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 µg/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 µg/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 µg/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.

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.

Tabla 6

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

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*.

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

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.

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

En un primer experimento, se usaron 3 ng/ml (0,3 ng) de anti-hPG MAb 3 y 1 µg/ml (0,1 µg) 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.

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.

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

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 prerrecubrieron placas de 96 pocillos con anticuerpos policlonales 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 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal biotinilado, generado frente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 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.

Los resultados muestran que concentraciones crecientes (µg/ml) de Anti-hPG MAB 3 disminuyen la capacidad de anticuerpos policlonales 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 epítomos

Los epítomos 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 epítipo putativo y se distribuyen en una membrana de nitrocelulosa que se ensaya con el anticuerpo de ensayo para determinar la mínima secuencia de

epítipo reconocida por el anticuerpo. El escaneo de alanina se usa para determinar los residuos en un epítipo que son críticos para la unión del anticuerpo: cada residuo en un epítipo 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 epítipos para anticuerpos ejemplificativos de la presente descripción. Para los anticuerpos monoclonales N-terminales frente a hPG MAb 1-4 y 15-20, los epítipos comprenden por lo menos las secuencias siguientes: DAPLG (SEC ID n°: 28), PDAPLG (SEC ID n°: 29), PRSQQPD (SEC ID n°: 30), WKPRSQQPD (SEC ID n°: 31), o WKPRSQQPDAPLG (SEC ID n°: 32), como se muestra en la tabla 8 siguiente.

10 Tabla 8

MAb	Antígeno peptídico PG: SWKPRSQQPDAPLG	SEC ID n°
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 MAb 5-7, 9-12, 14 y 21-23, los epítipos comprenden por lo menos las secuencias siguientes: FGRR (SEC ID n°: 33), MDFGR (SEC ID n°: 34), AEDEN (SEC ID n°: 35), y GWMDFGRR (SEC ID n°: 36), como se muestra en la tabla 9 siguiente.

Tabla 9

MAb	Antígeno peptídico PG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEC ID n°
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, LST174T, 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.
- 40 Después 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 SW480, células LS174T, y células HCT116 a partir de experimentos representativos. Los resultados son la media \pm 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 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.

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 \pm 3228		
Anti-hPG MAb 1	30425 \pm 3098	84,4	0,3556
Anti-hPG MAb 2	28925 \pm 2757	80,2	0,0476
Anti-hPG MAb 3	6050 \pm 1788	16,8	< 0,0001
Anti-hPG MAb 4	17560 \pm 3439	48,7	0,0002

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).

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 \pm 9071		
MAb3	62750 \pm 9194	41,5 %	< 0,0001
MAb4	82250 \pm 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 \pm 7520		
MAb3	-6666 \pm 5000	- 8 %	0,0084
MAb4	+8334 \pm 2500	7 %	0,0085

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* 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*.

La inhibición de la proliferación celular por los anti-hPG MAb 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 tratadas 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

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).

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.

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

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

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.

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.

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.

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

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}*, *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 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 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 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.

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 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 diseccionaron 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 APC Δ 14 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). Después 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 APC Δ 14 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 anomalías 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 APC Δ 14. 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 diseccionaron 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 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.

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 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.

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

Tabla 19

SEC ID n°:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYVHWVRQAPGQRLEWMGGF YPGNSDSRYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRRDSPQY WGQGTLLTVSS	hV_H3
22	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRLIY KVSNRFSQVDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPTFGGGT KVEIK	hV_L3

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.

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.

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

Tabla 20

SEC ID n°:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSSSWMHWRQAPGQGLEWMGIFLP SGSTDYAQKFQGRVTMTDRDTSSTVYMELSSLRSEDVAVYYCATDGNDFWYAW GQGTLLTVSS	hV_H4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSSGVTYLYWYLQKPGQSPQLLIYKVS NRFSQVDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHPVPTFGQGTLEIK	hV_L4

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 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-124, respectivamente, para equiparar con el gen IGHJ6*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, IGKV2-109*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 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_k 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_k proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 21

SEC ID n°:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
75	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMNWRQAPGKGLEWVSSISSGGTYTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV _H 8a
76	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLRHTKGITFLDWYLQKPGQSPQLLIYQMSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLPLTFGGGTKEIK	hV _k 8a
77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGGTYTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV _H 8b
78	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLRHTKGITFLYWLQKPGQSPQLLIYQMSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLPLTFGGGTKEIK	hV _k 8b
79	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSGGTYTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV _H 8b

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 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 gen IGHJ4*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.

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 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_k 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_k proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 22

SEC ID n°:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
------------	--------------------------	----------

80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYGMWVRQAPGKGLEWVANINFTG DRTYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGT TVSS	hV _H .13a
81	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRR LNILV SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPQT FGGGTKVEI K	hV _k 13a
82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYGMWVRQAPGKGLEWVASINFTG DRTYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGT TVSS	hV _H 13b
83	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRR LNILV SKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPQT FGGGTKVEI 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 n°:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
84	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPS NGGTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWG QGTTVTSS	hV _H 16a
85	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRR LNILV SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHSPYTFGGG TKLEI K	hV _k 16a
86	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMYWVRQAPGQGLEWMGIINPS NGGTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWG QGTTVTSS	hV _H 16b
87	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLWYFQQRPGQSPRR LNILV SNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHSPYTFGGG TKLEI K	hV _k 16b
88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMYWVRQAPGQGLEWMGEINP SNGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWG QGTTVTSS	hV _H 16c
89	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGKTYLWYFQQRPGQSPRR LNILV SERDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHSPYTFGGG TKLEI 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, 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 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 n°:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
90	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWSWIRQHPGKGLEWIGYISFS GYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDY WGQGTLTVSS	V _H 19a
91	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRTYTIAWHQQQPEKGPRYLMKVKKDG SHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGG TKVEIK	V _k 19a
92	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYISFS GYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDY WGQGTLTVSS	V _H 19b
93	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRTYTIETWHQQQPEKGPRYLMKVKKDG SHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGG TKVEIK	V _k 19b
94	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYISFS GYTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDY WGQGTLTVSS	V _H 19c
95	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRTYTIETWHQQQPEKGPRYLMKVKKDG SHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGG TKVEIK	V _k 19c

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

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp

45 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
 <210> 5
 40 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 45 <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

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <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"

 <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

 <210> 11
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

 <400> 11

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr
1 5

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

<220>
<221> fuente
10 <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

<220>
20 <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 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14

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

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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
20 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 15

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

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

<220>
 <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 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac 96
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att 144
 Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 ggt ggt ttt tat cct gga aat agt gat tct agg tac aac cag aaa ttc 192
 Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ctg act gca gtc aca tcc gcc agt act gcc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gac ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288
 Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 aca aga aga gat agt ccc cag tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca 336
 Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 gtc tcc tca 345
 Val Ser Ser
 115
 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

```

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

```

<210> 18

<211> 354

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

```

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

```

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

```

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

10

<400> 20

15

```

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

```

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

20

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

25

<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 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 23
 <211> 118
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 25 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <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
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

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

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<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

<210> 27
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 27

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

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

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <400> 28

Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 29

Pro Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35 <400> 30

Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
40 <400> 31

Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
1 5

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <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
 35
 <400> 35

 Ala Glu Asp Glu Asn
 1 5
 40
 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

 Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg
 1 5
 45
 <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

<213> Secuencia artificial

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

<400> 38

Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

10 <210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

20 <400> 39

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

25 <210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 40

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala
1 5

35 <210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

45 <400> 41

Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
1 5

50 <210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 42

60 Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr
1 5

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

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

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

<220>
<221> fuente
10 <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 <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
1 5 10

40 <210> 51
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

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

50 <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"

<400> 52
 Gln Met Ser
 1
 5 <210> 53
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 15 <400> 53
 Leu Val Ser
 1
 20 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 54
 Val Lys Lys Asp Gly Ser His
 30 1 5
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 40 <400> 55
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5
 45 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 56
 55 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

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

<400> 57

5 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 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

<220>
 <221> fuente
 40 <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

<210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 66

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

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

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

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

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

<400> 67

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

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

<220>
 <221> fuente

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

```

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

 <220>
 <221> fuente
 <223>/nota="Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"
 10
 <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 gcc aca tat tac tgt 288
 Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga gag gtc aac tat ggg gac tcc tac cac ttt gac tac tgg ggc 336
 Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 caa ggc acc att gtc aca gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

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

 <220>
 <221> CDS
 30 <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 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65      70      75      80
agc aga gtg gag gct gag gat ttg ggt gtt tat tac tgt gct caa aat      288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85      90      95
cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa      336
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100      105      110

```

<210> 72

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 72

```

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

```

<210> 73

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<220>

<221> CDS

ES 2 690 943 T3

<222> (1)..(336)

<400> 73

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

<210> 74

<211> 345

<212> ADN

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

25 <210> 75

<211> 117

<212> PRT

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

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

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

25

<210> 77

<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
115
```

<210> 78

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 78

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

<210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 79

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 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 82

<211> 114

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 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 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 84

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<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 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

20 <210> 87
 <211> 112
 <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 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"

<400> 88

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 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

<220>

<221> fuente

25 <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 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

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

5 <210> 92
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <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 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"

15 <400> 94
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<220>
 <221> fuente
 25 <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 Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45
 Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 100 105 110
 Glu Ile Lys
 115
 <210> 96
 <211> 29
 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"

<220>
5  <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

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

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

   <400> 99

   Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
   1           5           10           15
25

```

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.
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.
 10
3. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 2, en el que dichas células de cáncer colorrectal son las células de LS174T.
 15
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.
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.
 20
6. Anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está humanizado.
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:
 25 (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. Hibridoma 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.
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.
 65

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.

5 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.

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:	M QRLCVYVLIF ALALAAFSEA	SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LLELPWLEQQG
	-21-11-1	1	11	21
	PASHHRRQLG PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWMD	FGRRSAEDEN
	3141	51	61	71
Progastrin:		SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LLELPWLEQQG
		1	11	21
	PASHHRRQLG PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWMD	FGRRSAEDEN
	3141	51	61	71
G34:	QLG PQGPPHLVAD	PSKKEGPWLE	EEEEAYGWMD	F-NH ₂
	41	51	61	71
G34-Gly:	QLG PQGPPHLVAD	PSKKEGPWLE	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

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGGTTCCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCCAAAGGCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCTGTCAAGGCTTCTGGCTACATCTTTACCAGCTACTGGG									
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y I F T S Y W									
mV _H CDR 1.3									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TACACTGGGTTAAACAGAGGSCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGGTTTATCCTGGAAATAGTGATTTAGGTACAACACAGAAAATTCAAAGGGCAA									
V H W V K Q Q R P G Q G L E W I G G F Y P G N S D S R Y N Q K F K G K									
mV _H CDR 2.3									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GGCCACACTGACTGCAGTACATCCGCCAGTACTGCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTACAAGAAGAGAT									
A T L T A V T S A S T A Y M D L S S L T N E D S A V Y F C T R R D									
mV _H CDR 3.3									
310	320	330	340						
AGTCCCCAGTACTGGGGCCAAAGCACCACCTCTCACAGTCTCCTCA									
S P Q Y W G Q G T T L T V S S									
mV _H CDR 3.3									

FIG. 2B

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																								
GATGTTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTTCAGTCTTGGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTTGTACATAGTAATG																																	
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	
										mV _L CDR 1.3																							
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																								
GAAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT																																	
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
										mV _L CDR 2.3																							
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																								
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTCACATGTTCCG																																	
S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	L	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	H	V	P	
										mV _L CDR 3.3																							
310	320	330																															
TTCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA																																	
F	T	F	G	G	T	K	L	E	I	K																							
mV _L CDR 3.3																																	

FIG. 2C

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CAGGTT	CAGTCT	TGGAG	CTGAG	CTGAT	GAAGCC	CAGGGCC	CTCAGT	GAAGATAT	CCTGCAAGGCT
Q V Q L Q 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 S W								
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TAGAGT	GGTTAA	ACAGAG	GGCCTG	GACATG	GCCTTG	AGTGG	ATTG	GAGAGT	TTTACCTG
I E W L K Q Q R P G H G L E W I G E F L P G S G S T D Y N E K F K G K									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GGCCAC	ATTCACTG	CAGACAC	ATCCTCC	GACACAG	CCCTG	ACATG	CTACTC	AGCCTG	ACATCTG
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									
310	320	330	340	350					
AATTAT	GACTGG	TTTGCTT	ACTGGG	CCAAAGG	ACTCTG	GTCACTG	TTCTG	CA	
N Y D W F A Y W G Q G T L V T V S A									

mV_HCDR 1.4

mV_HCDR 2.4

mV_HCDR 3.4

mV_HCDR 3.4

FIG. 2D

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCTGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAGTG									
D L V 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 L V H S S									
mV _L CDR 1.4									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAGTCACCTATTACATTGGTACCTGCAGAAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT									
G V T Y L H 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									
mV _L CDR 1.4									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCCT									
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P									
mV _L CDR 2.4									
310	320	330							
CCCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA									
P T F G S G T K L E I K									
mV _L CDR 3.4									
mV _L CDR 3.4									

FIG. 2E

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCCTCTGGATTCACTTTCACCTACCTATGCCA									
E V Q L V E S G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F T Y A									
mV _H CDR 1.8									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGTCTTGGGTTCCGACAGACTCCGGAGAGAGGCTGGAGTGGGTGGTACCTTAGTACCTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCG									
M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S S G G T Y T Y Y P D S V K G R									
mV _H CDR 2.8									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ATTCACCATCTCCAGAGACAAATGCCAAGAACGCCCTATACCTTGCAAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAACACAGGGG									
F T I S R D N A K N A L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A T Q G									
mV _H CDR 3.8									
310	320	330	340						
AATTACTCTTTGGACTTCTGGGGCCAGGACCTCTCTCAGTCTCCTCA									
N Y S L D F W G Q G T S L T V S S									
mV _H CDR 3.8									

FIG. 2F

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GACATTGTGATGACGCAGGCTGCATCCTCTAATCCAGTCACTCTTGGAACATCCGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCGACATATAAAG									
D I V M T Q A A S 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
GCATCACTTTTTTGTATGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTTGATTTATCAGATGTCCAACTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT									
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 1.8									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CAGTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAAAATCTAGAACTTCCG									
S S S G S G T D F T L R I S R V E A E D L G V Y Y C A Q N L E L P									
mV _L CDR 2.8									
310	320	330							
CTCACGTTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA									
L T F G A G T K L E L K									
mV _L CDR 3.8									
mV _L CDR 3.8									

FIG. 2G

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCCTCTGGATTTCATTTTCAGTAGCTATGGCA									
E V Q L V E S G 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									
<hr/>									
mV _H CDR 1.13									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TGTCTTGGGTTGCCAGTCTCCAGACAGGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTAACTATTGGTGATAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG									
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 Y P D S V K G R									
<hr/>									
mV _H CDR 2.13									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ATTCACCATCTCCAGAGACAAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGTGCAAAATGACCAAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATTATTACTGTGCAAGAGGGACC									
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 C A R G T									
<hr/>									
mV _H CDR 3.13									
310	320	330	340						
GGAACCTACTGGGGCCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA									
G T Y W G Q G T T L T V S S									
<hr/>									
mV _H CDR 3.13									

FIG. 2H

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCACTTGTTCGGTTAACATTGGACAACCAAGCCCTCCATCTCCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCCTCTTAGATAGTGATG									
D V V L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D									
mV _L CDR 1.13									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAAGACATATTTGGAATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCCTGACAGGTT									
G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F									
mV _L CDR 1.13									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCT									
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H F P									
mV _L CDR 2.13									
310	320	330							
CAGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGGAAATCAAA									
Q T F G G G T K L E I K									
mV _L CDR 3.13									
mV _L CDR 3.13									

FIG. 2I

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																								
CAGGTCCA	ACTGCAGC	AGTCTGGG	GGCTGAA	CTTGGG	CTTCAGT	GAACTT	CTCCTG	CAAGGCT	TCTGGCTAC																								
Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	Y	
mV _H CDR 1.16																																	
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																								
TGTACTGG	GTGAAG	CAGAGG	CGCTGG	ACAGG	CGCTTG	AGTGG	ATTG	GAGAG	ATTAA	TCCCTAG	CAATGG	TGGTACT	TAAC	TTCA	ATGAG	AA	TTCA	AGAG	CA														
M	Y	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	E	I	N	P	S	N	G	G	T	N	F	N	E	K	F	K	S	K
mV _H CDR 2.16																																	
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																								
GGCCACAC	TGACTG	TAGACA	AAATCC	TCCAGC	ACAGC	ACATAC	ATGCA	ACTCAG	CAGCCTG	ACATCTG	AGGACT	CTGCGG	TCTATT	ACTGTG	TACA	AGAG	CGGT																
A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	C	T	R	G	G		
mV _H CDR 3.16																																	
310	320	330	340	350																													
TACTACCC	CTTTGAC	TACTG	GGGCCA	AGGCACC	ACTCTC	CAGTCT	CTCA																										
Y	Y	P	F	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S																	
mV _H CDR 3.16																																	

FIG. 2J

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTTGTGTTACCATTTGGGCGCCAGCCTCCATCTCTTGAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTTAGACAGTGATG									
D V V M T Q T P L T L S V T I G R P A S I S C K S S Q S L L D S D									
mV _L CDR 1.16									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GAAAGACATATTTGTATTGTTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGTGTTCTGAGCTGGACTCTGGAGTCCCTTGACAGGAT									
G K T Y L Y W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S E L D S G V P D R I									
mV _L CDR 1.16									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CACTGGCAGTGGGTCGGGGACAGATTTACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGAACACATTTCTCCG									
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C W Q G T H S P									
mV _L CDR 2.16									
310	320	330							
TACAGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA									
Y T F G G G T K L E I K									
mV _L CDR 3.16									
mV _L CDR 3.16									

FIG. 2K

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACATGCACCTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATG									
D V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T G Y S I T S D Y									
mV _H CDR 1.19									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
CCTGGAATTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGGCTACATAAGCTTTCAGTGGTTACACTAGTTACAACCCATCTCTCAAAAAGTCG									
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									
mV _H CDR 2.19									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AATCTCTGTCACTCGGGACACATCCAGGAACCAATTCTTCCCTCCAGTTGACTTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGAGGTC									
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									
mV _H CDR 3.19									
310	320	330	340	350	360				
AACTATGGGGACTCCTACCACCTTTGACTACTGGGGCCCAAGGCACCATTTGTCACAGTCTCCTCA									
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
CAACTTGGCGTCACTCAGTCATCTTCAGCCTCTTTCTCCCTGGGAGCCTCAGCAAACTAACGTGCACCTTTGAGTAGTCAACACAGAACGTACACCATTG									
Q L A L T Q S S S A S F S L G A S A K L T C T L S S Q H R T Y T I									
mV _L CDR 1.19									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
AATGGTATCAGCAACAGTCACCTCAAGCCTCCTTAAGTATGTGATGGAGGTTAAGAAAGATGGAAGCCACAGCACAGGTCAATGGGATTCCTGATCGCTTCTC									
E W Y Q Q Q S L K P P K Y V M E V K K D G S H S T G H G I P D R F S									
mV _L CDR 2.19									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
TGGATCCAGTTCTGGTGTGATCGCTACCTCAGCAATTCACATCCAGCCTGAAGATGAAGCAATATACATCTGTGGTGGGTGATGCAATTAAAGGA									
G S S S G A D R Y L S I S N I Q P E D E A I Y I C G V G D A I K G									
mV _L CDR 3.19									
310	320	330	340						
CAATCTGTGTTTGTGTTTTCGGCGGTGGCACCAAGGTCACTGTCTTA									
Q S V F V F G G G T K V T V L									
mV _L CDR 3.19									

FIG. 3A

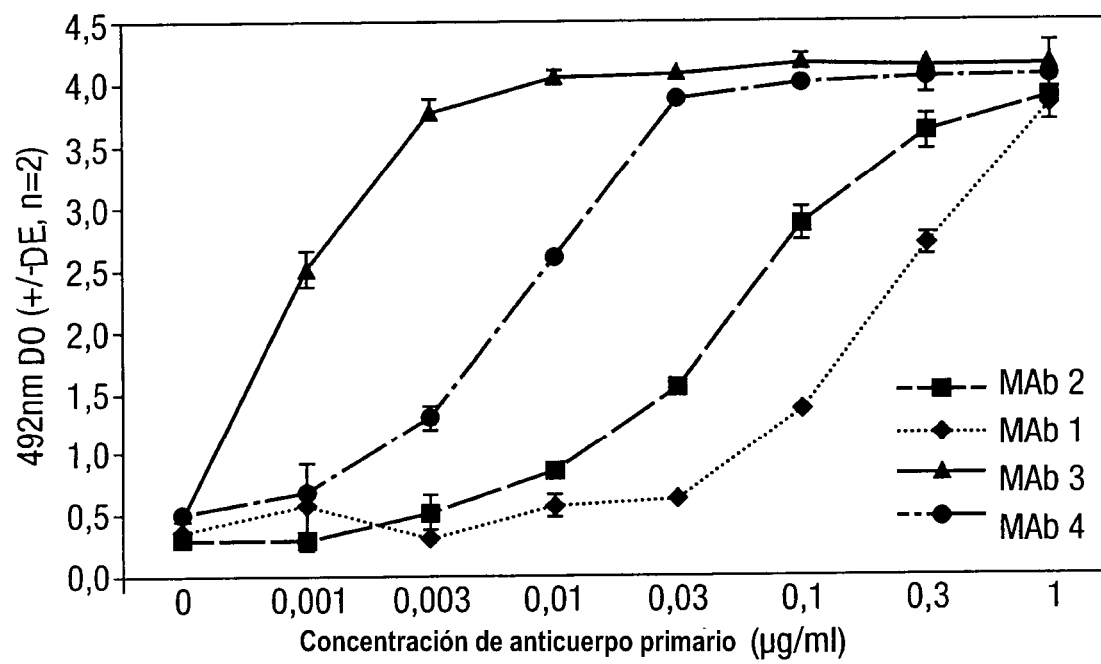


FIG. 3B

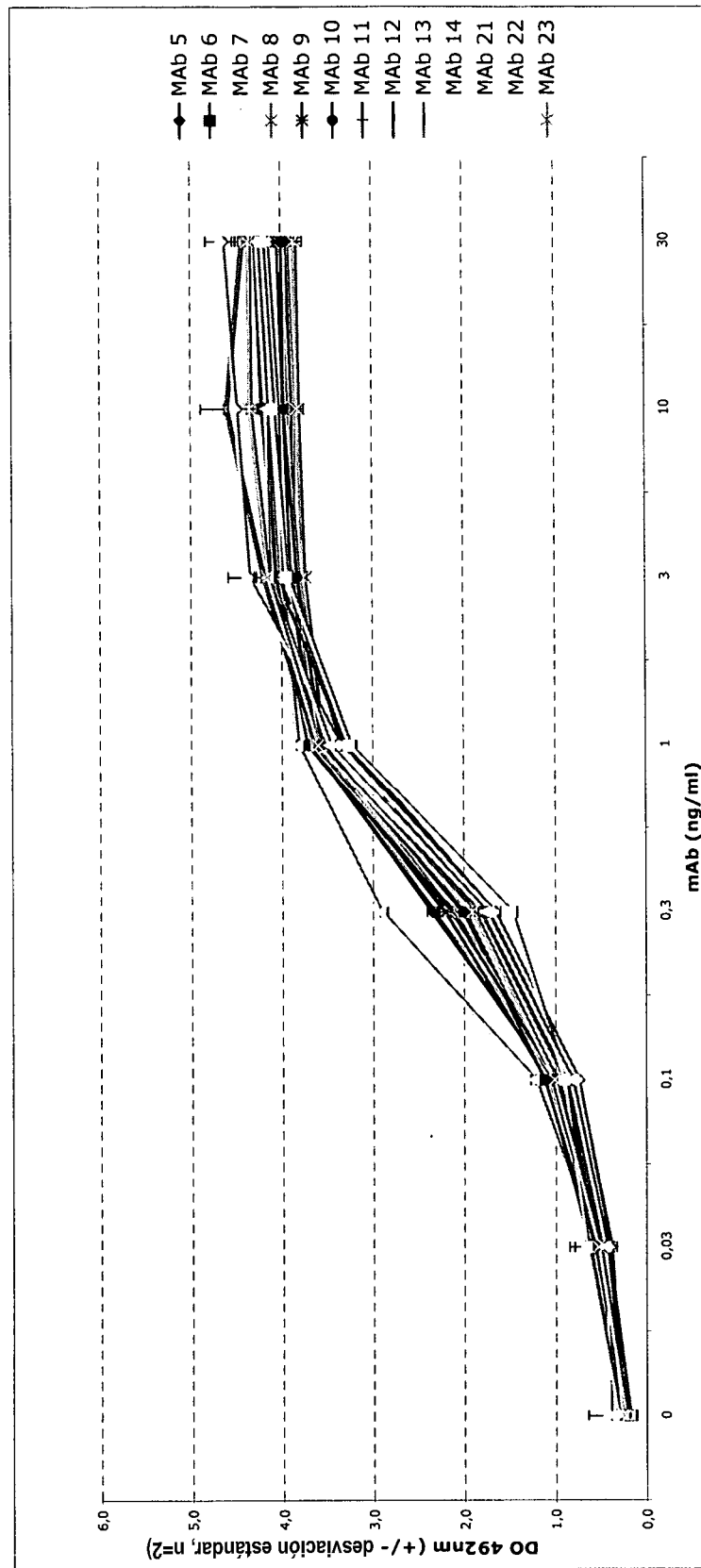


FIG. 3C

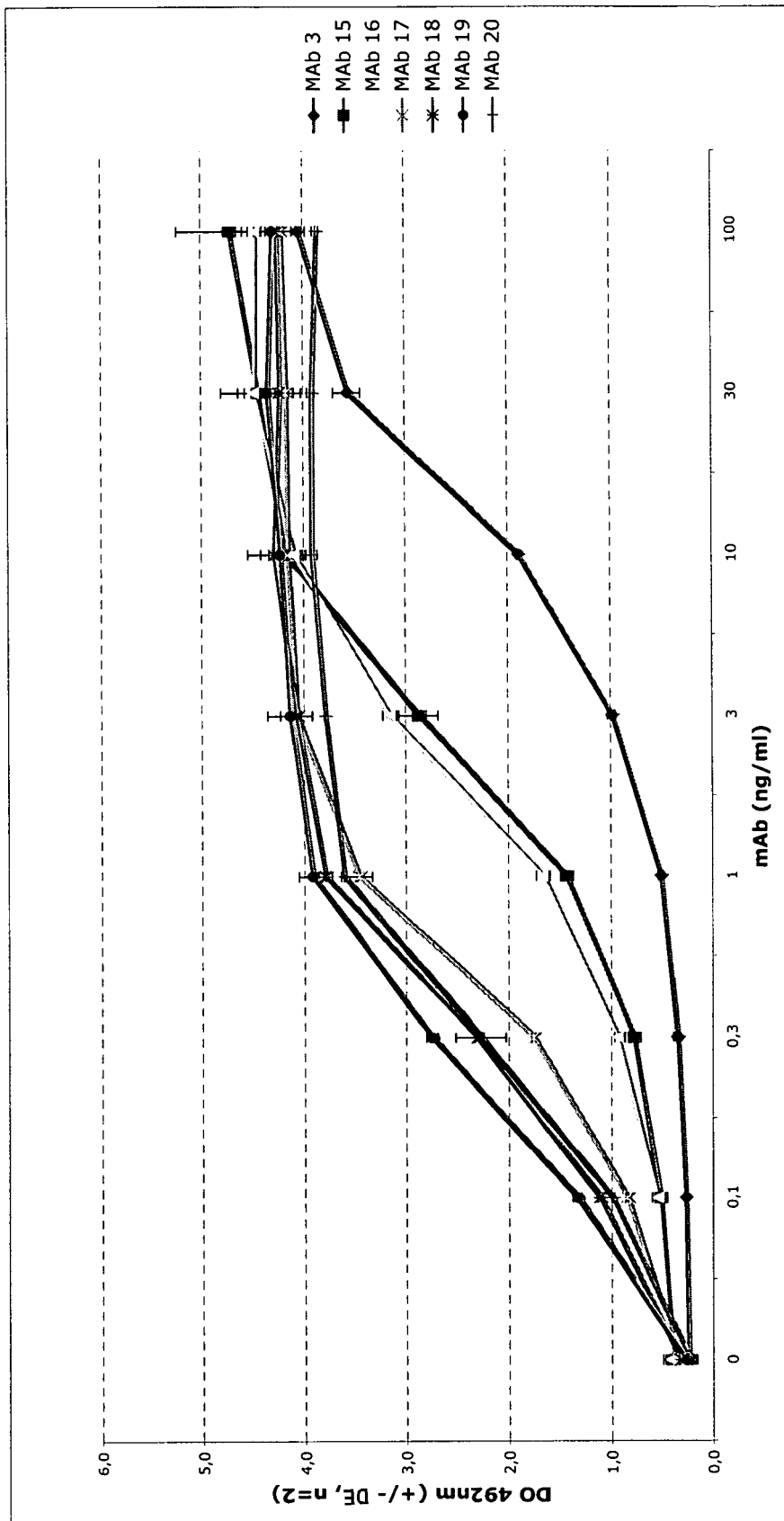


FIG. 4

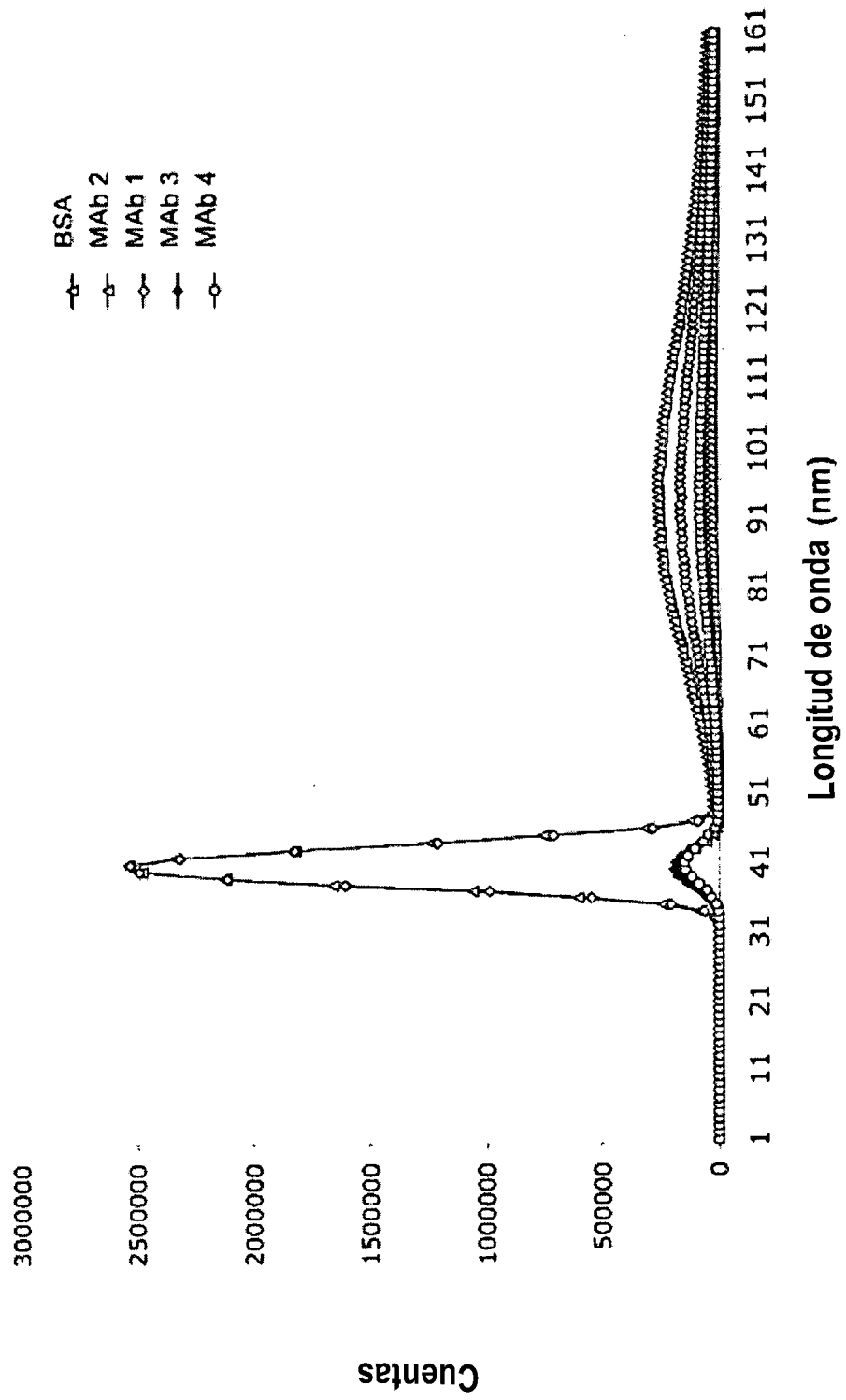


FIG. 5A

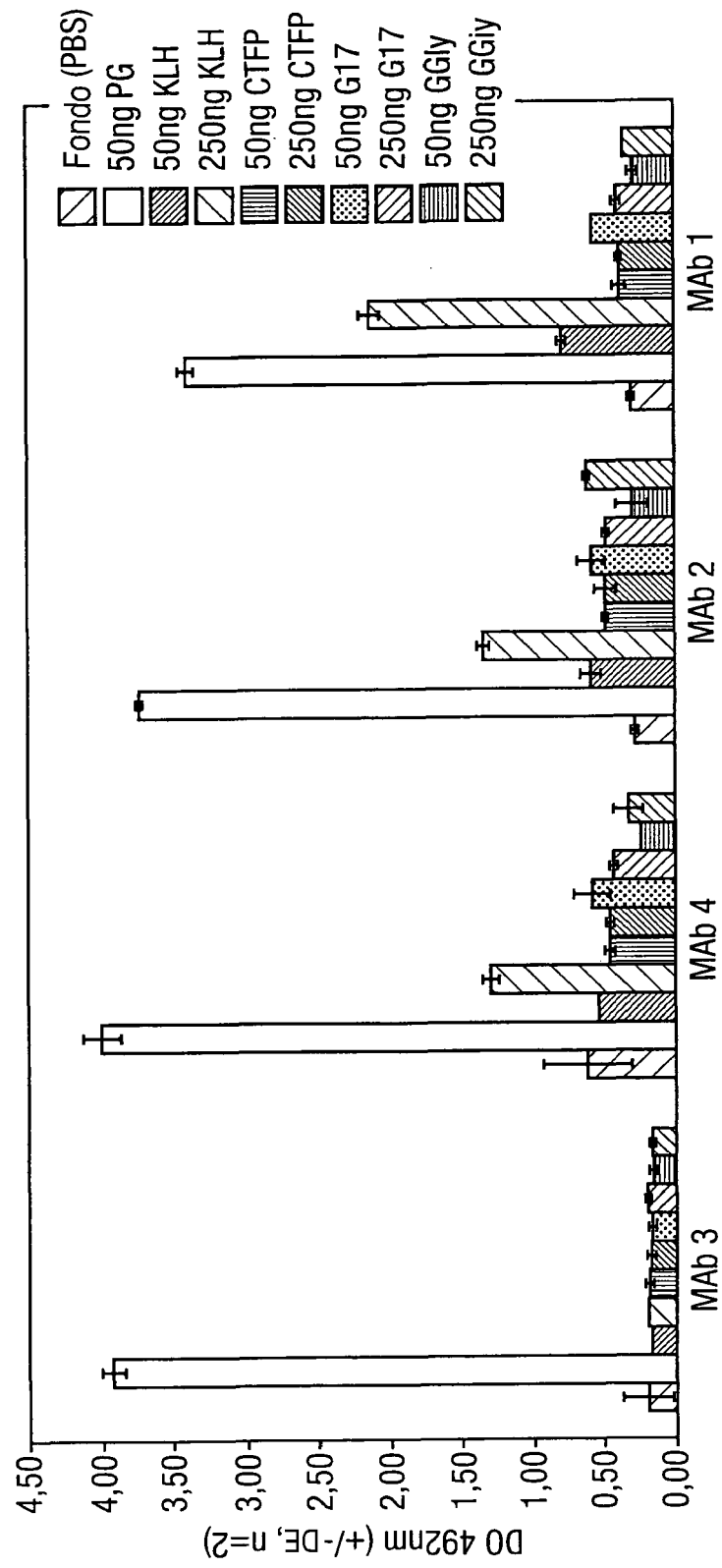


FIG. 5B

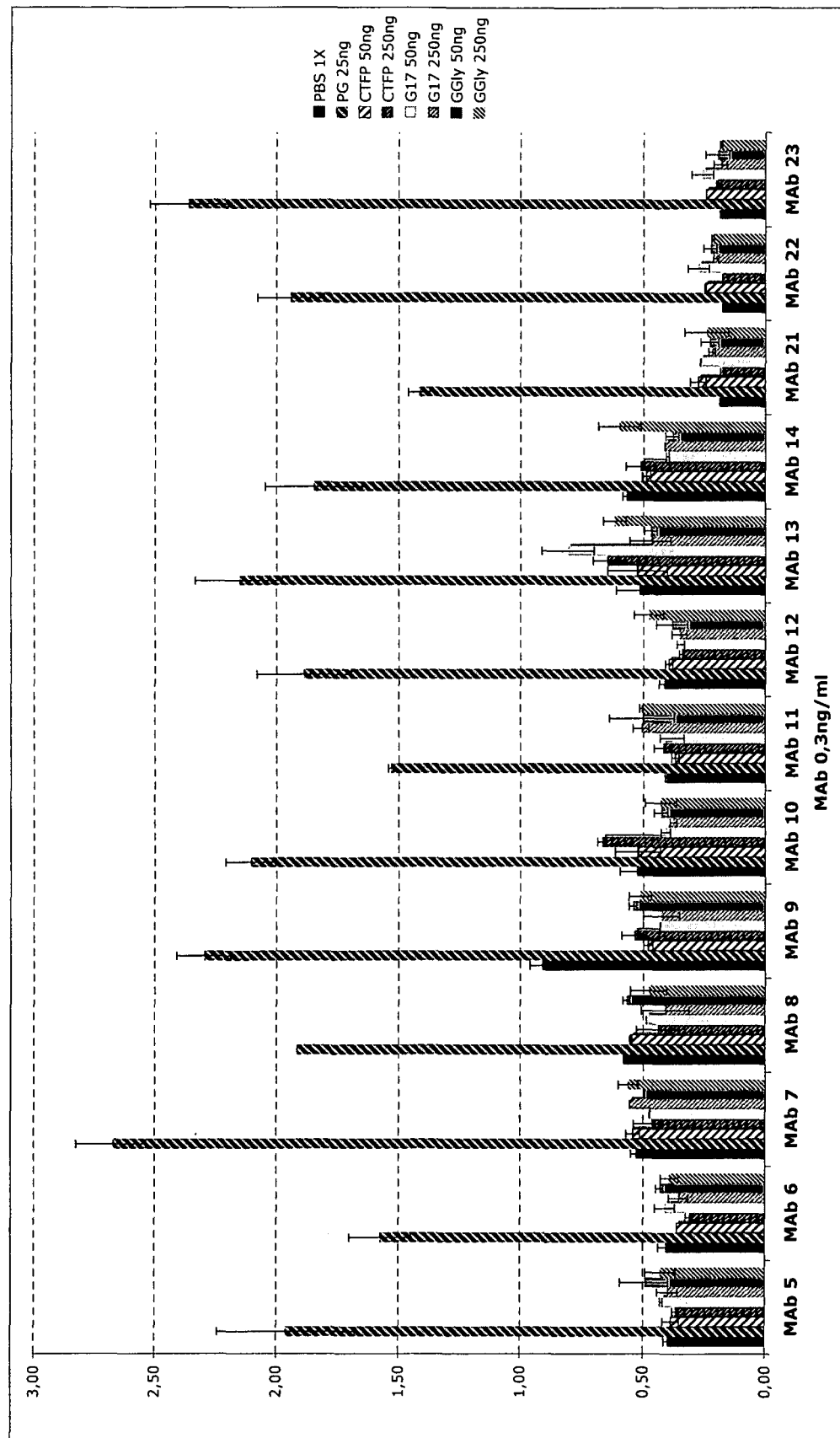


FIG. 5C

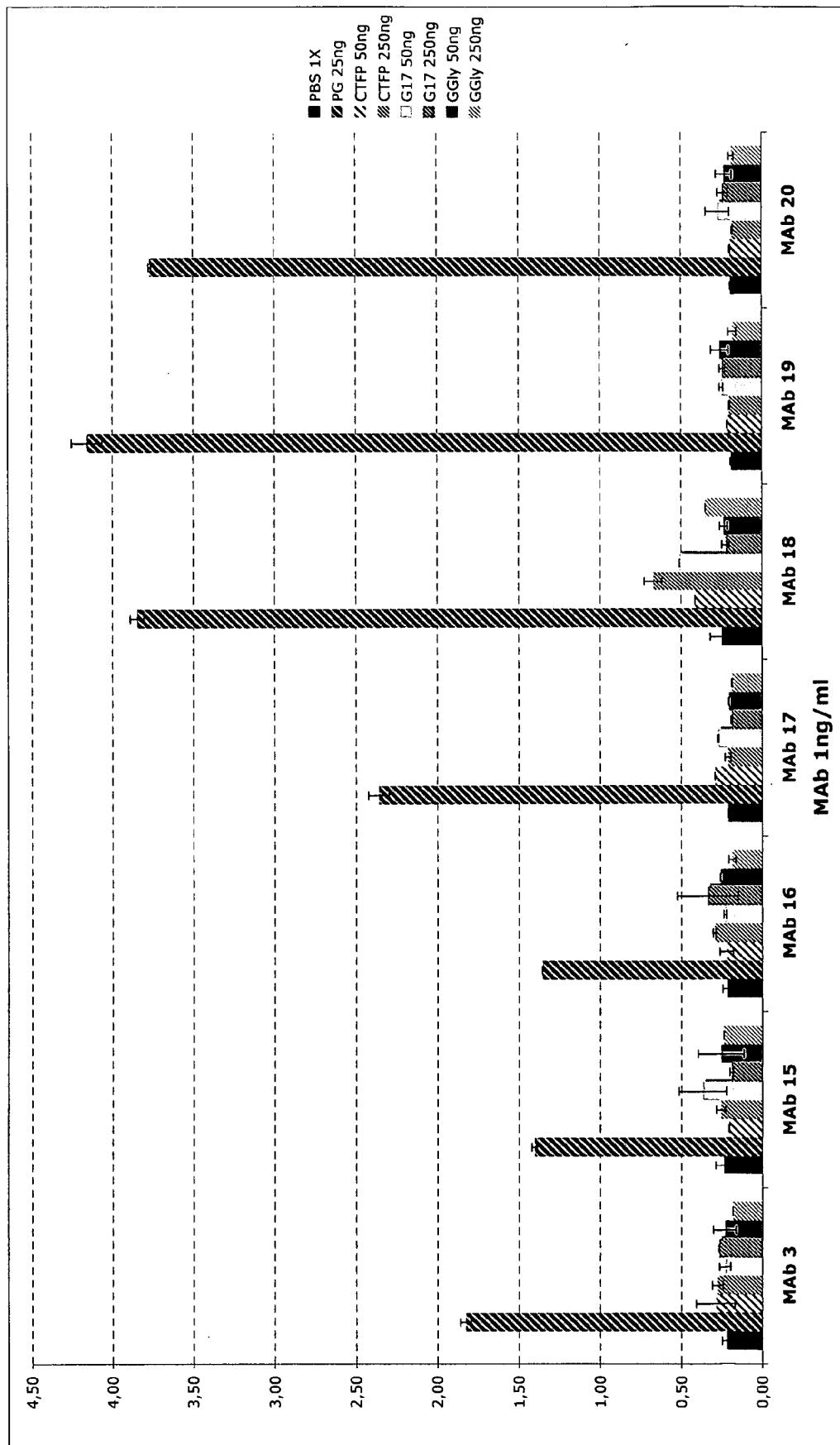


FIG. 6

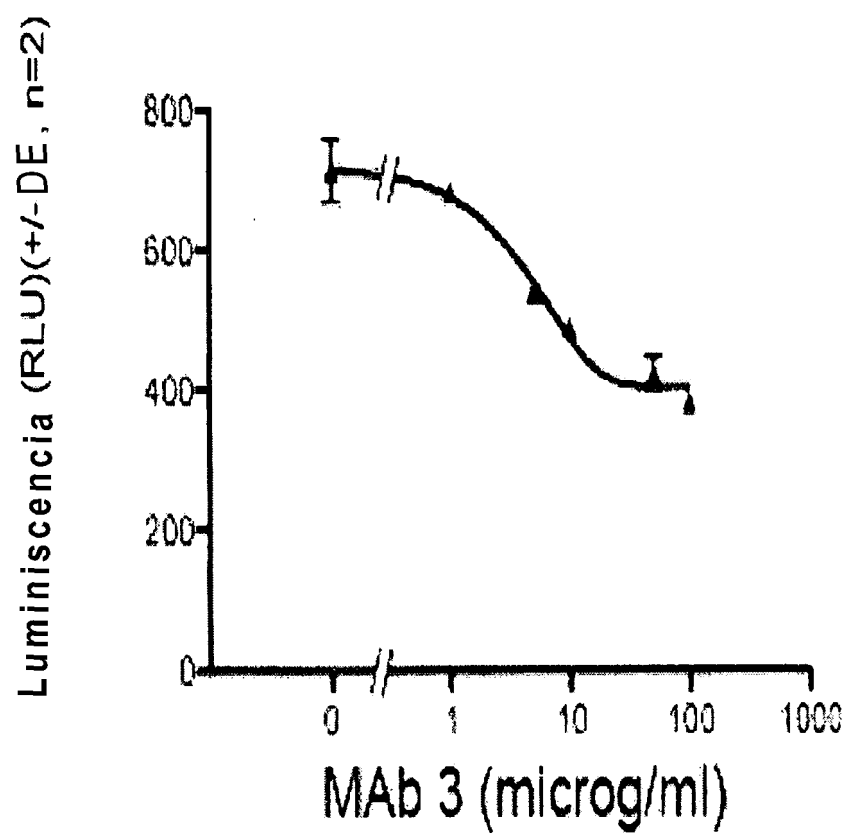


FIG. 7A

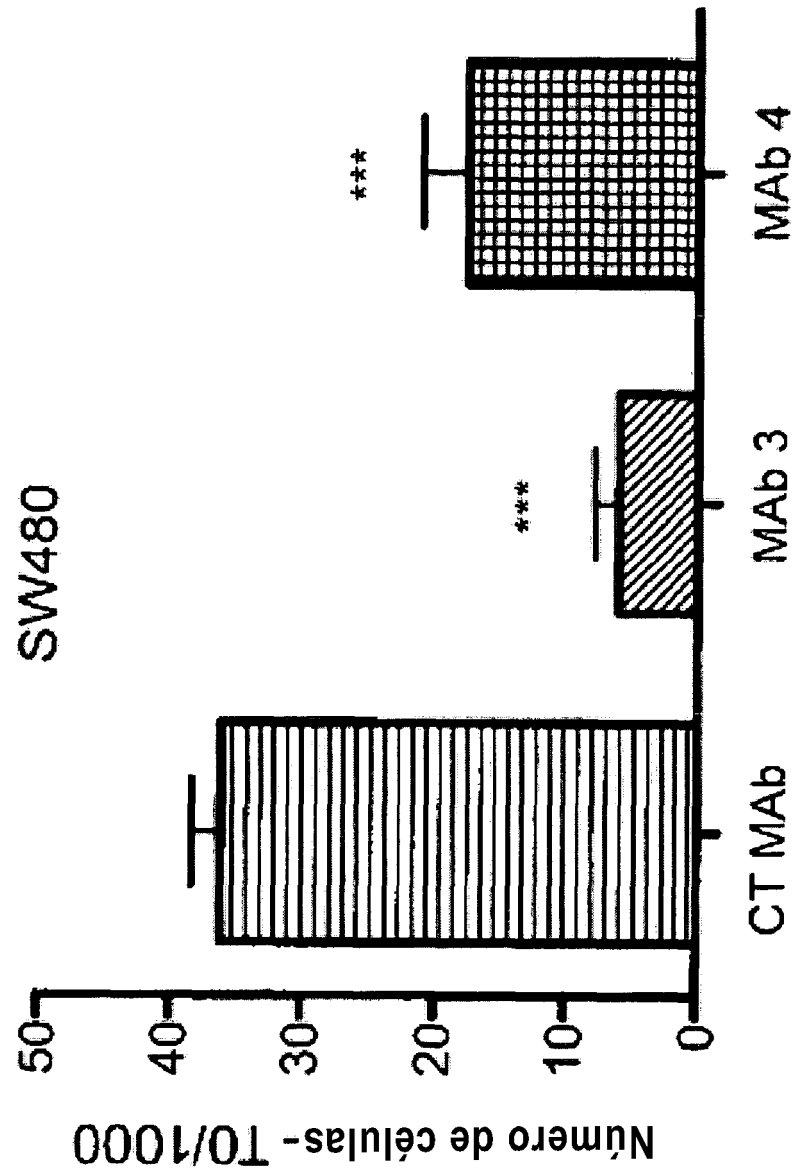


FIG. 7B

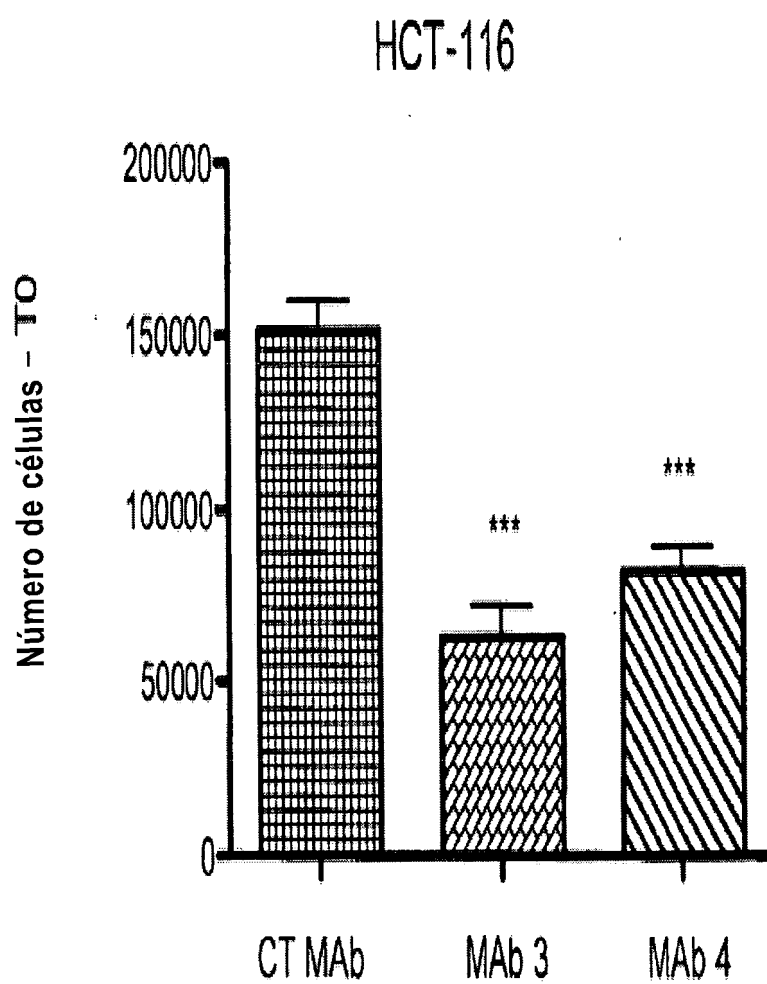


FIG. 7C

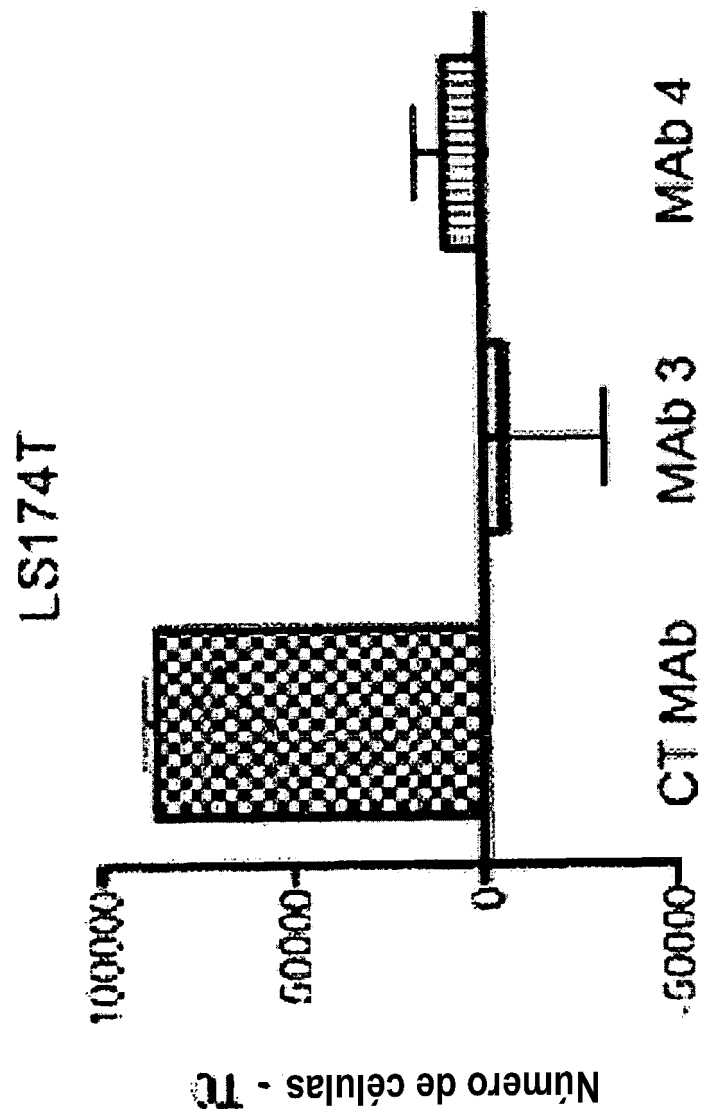


FIG. 7D

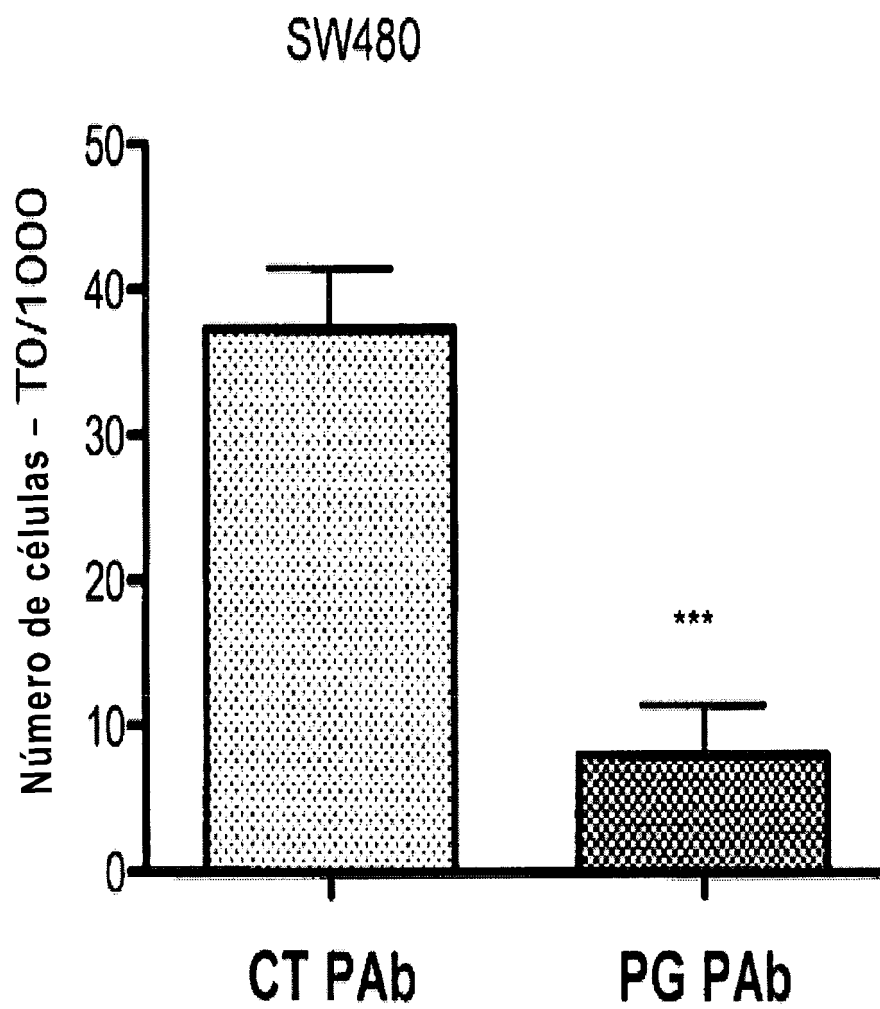


FIG. 7E

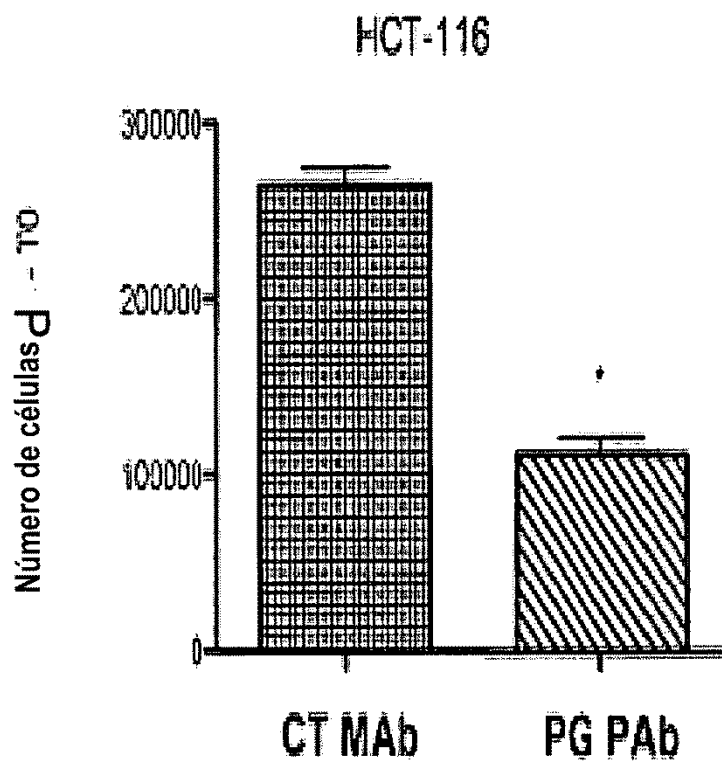


FIG. 7F

LS174T

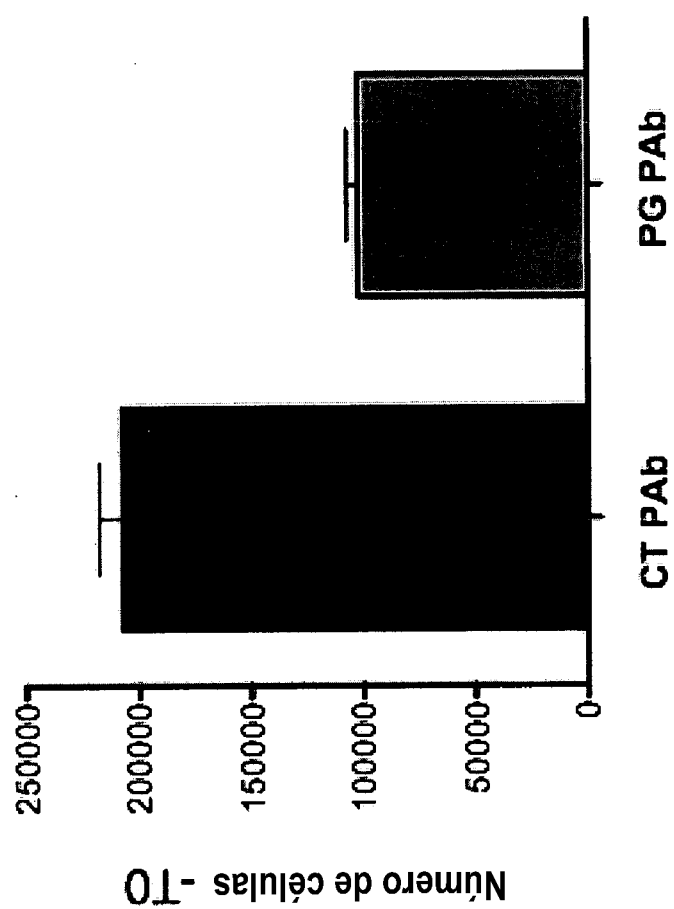


FIG. 7G

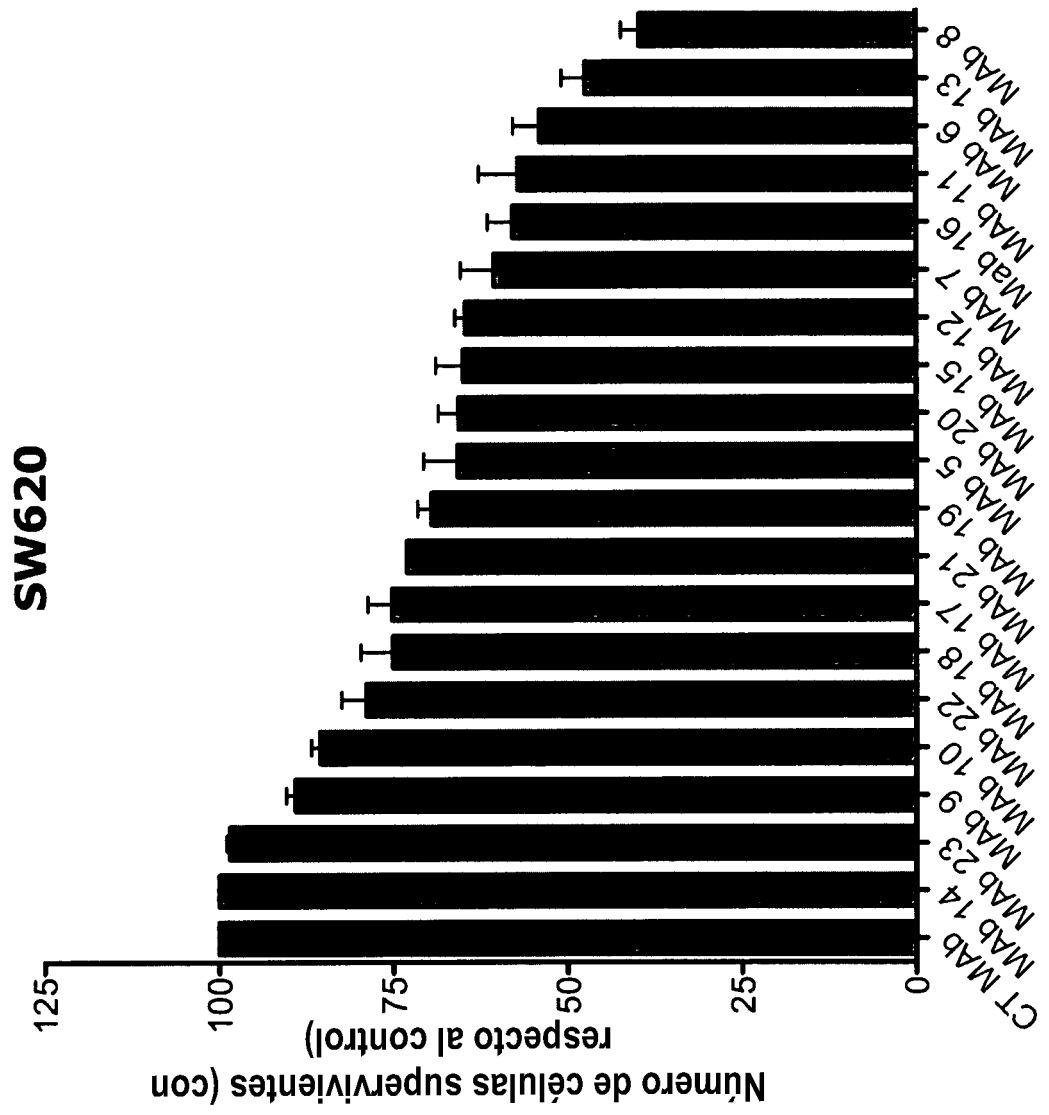


FIG. 7H

LS174T

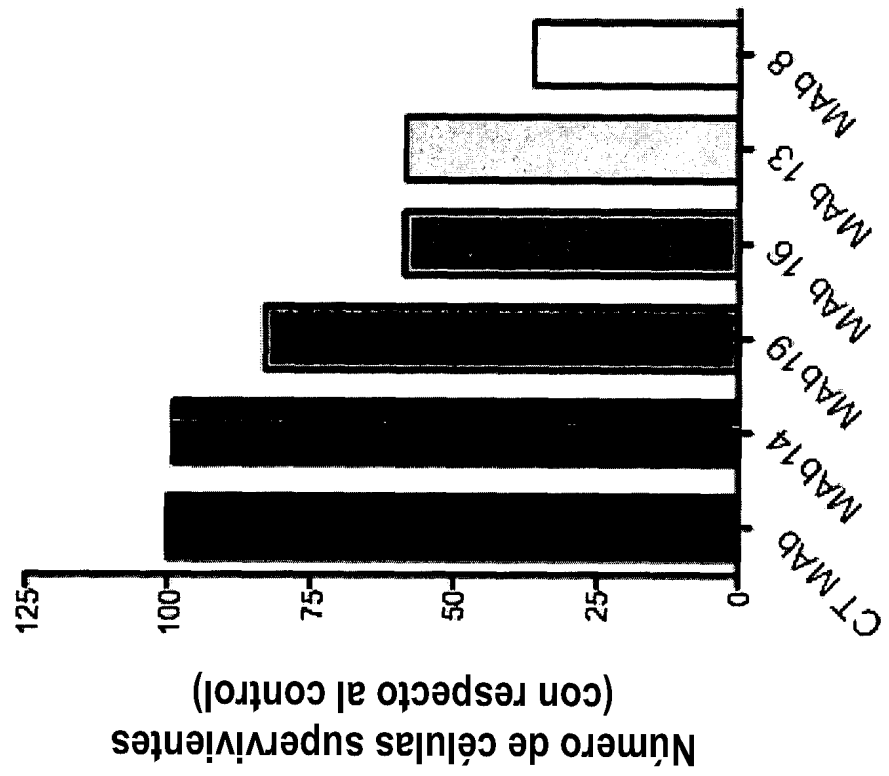


FIG. 7I

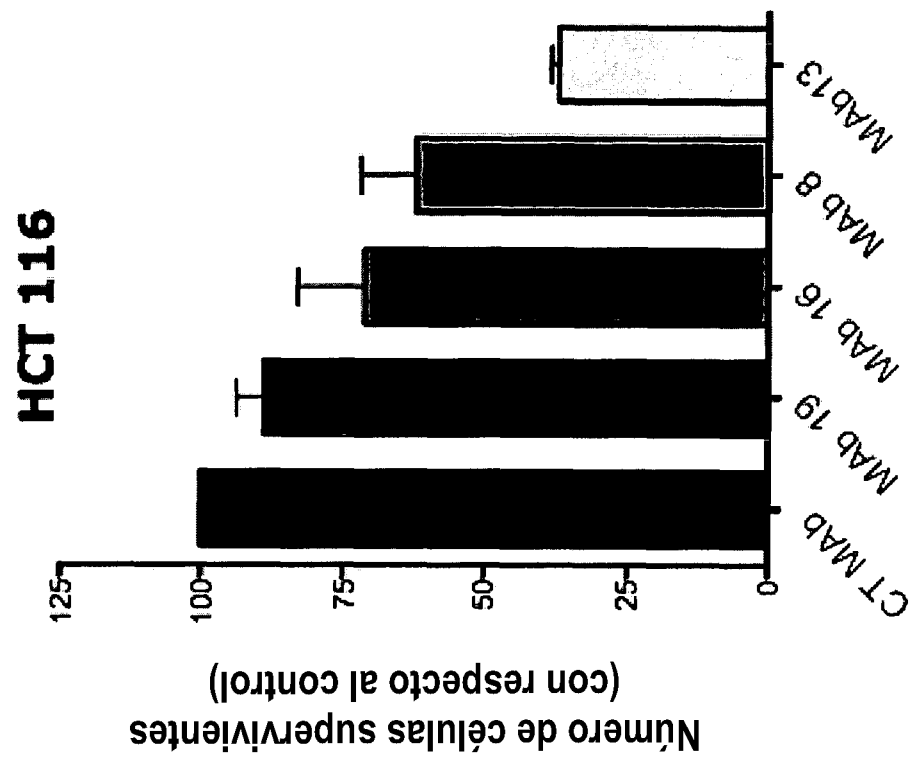


FIG. 8

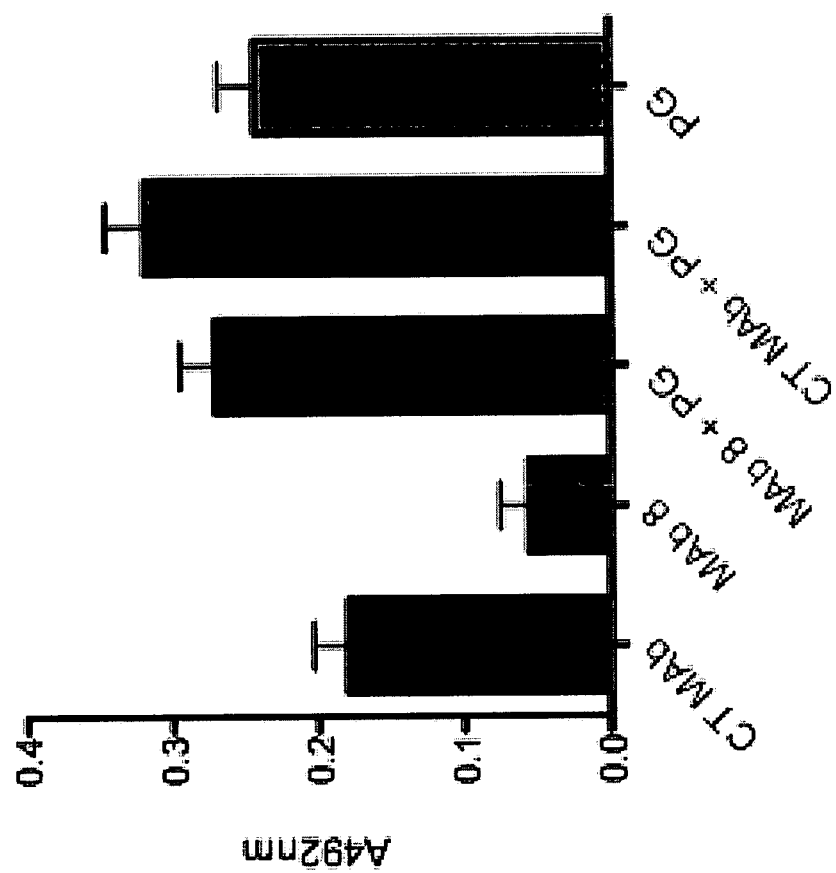


FIG. 9A

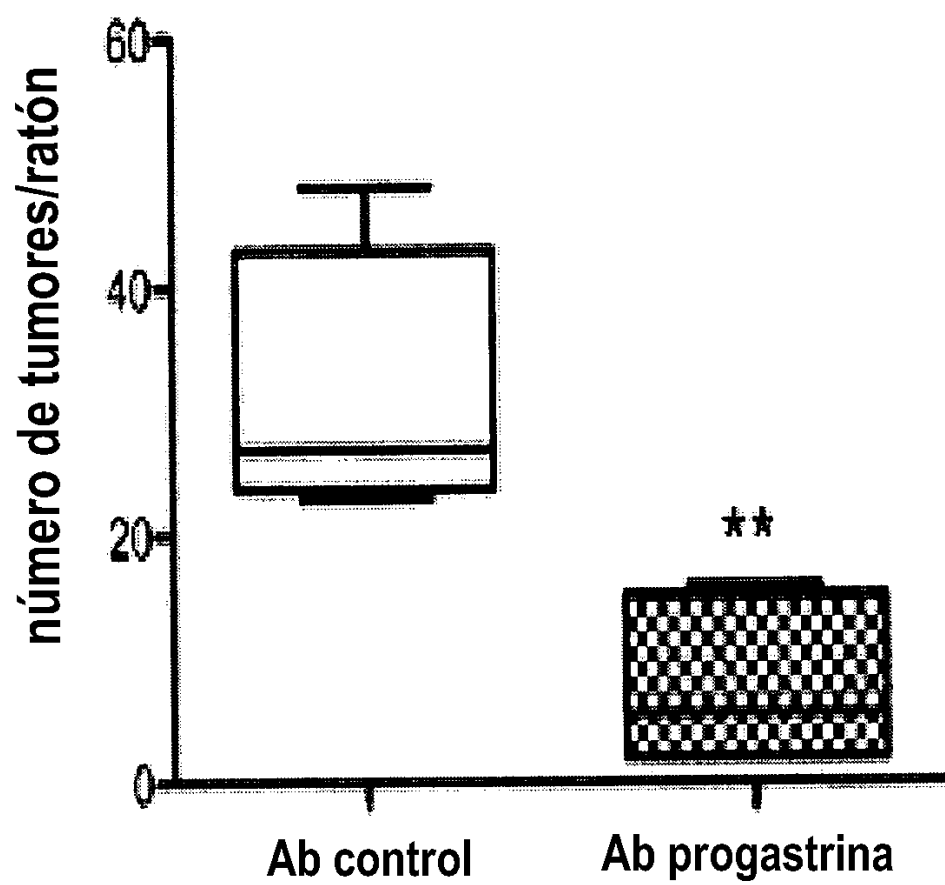


FIG. 9B

