

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 774**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/26</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/46</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/13</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/12</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2011 PCT/EP2011/001448**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11116954**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2011 E 11710711 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2550294**

54 Título: **Profilaxis de cáncer colorrectal y gastrointestinal**

30 Prioridad:

**24.03.2010 US 317245 P**

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

**20.04.2020**

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:

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

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

**Observaciones:**

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

**ES 2 754 774 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

Profilaxis de cáncer colorrectal y gastrointestinal.

5 **1. Campo de la invención**

La presente descripción se refiere, entre otros, a métodos para prevenir cáncer colorrectal y/o gastrointestinal en sujetos predispuestos a desarrollar pólipos adenomatosos administrando al sujeto una composición que comprende un anticuerpo específico para progastrina.

10

**2. Antecedentes**

El cáncer del tubo digestivo, incluyendo cáncer colorrectal ("CRC"), afecta a centenares de miles de personas cada año, y solo en los Estados Unidos de América se producen cada año decenas de miles de muertes relacionadas con CRC. Ver Rustgi, 2010, "The genetics of hereditary colon cancer", Genes & Development 21:2525-2538. El CRC puede surgir de diferentes maneras, una de las cuales es la transformación de pólipos adenomatosos en tumores malignos. La poliposis adenomatosa puede ser heredada, como es el caso de personas con poliposis adenomatosa familiar ("FAP"), o puede ser esporádica. Las personas con FAP o con poliposis adenomatosa esporádica portan mutaciones del gen supresor de tumores Adenomatous Polyposis Coli ("APC"), que están asociadas con la formación de pólipos adenomatosos en el intestino delgado, colon y/o recto. A su vez, estos pólipos se pueden desarrollar en cáncer colorrectal y gastrointestinal. En el caso de poliposis adenomatosa esporádica, una aflicción no hereditaria que subyace a muchos casos de CRC, el gen APC está mutado en células somáticas. Las personas con poliposis adenomatosa esporádica desarrollan pólipos benignos, un subconjunto de los cuales puede transformarse subsiguientemente en carcinomas malignos.

15

20

25

FAP da cuenta de alrededor de 1% de todos los casos de CRC, y afecta a uno en 13,000 nacimientos. *Id.* La mutación de APC en pacientes con FAP está asociada con la formación de centenares a miles de pequeños pólipos adenomatosos a lo largo del colon. La progresión de los pólipos hacia la neoplasia es virtualmente inevitable. De media, sin tratamiento profiláctico, las personas con FAP desarrollan CRC hacia la edad de 39 años. El tratamiento profiláctico es la norma asistencial, e implica cirugía radical, incluyendo la extirpación del colon, o tanto del colon como del recto, generalmente antes de la edad de 25 años. Aunque la profilaxis es preferible a la falta de tratamiento, la resección quirúrgica del colon (colectomía) en pacientes jóvenes altera gravemente la calidad de vida. Además, la resección quirúrgica sola puede ser inadecuada para mantener a los pacientes libres del cáncer: los pacientes que se someten a colectomías tienen un riesgo elevado de desarrollar pólipos y cáncer en el tubo digestivo superior. Hay una importante necesidad de tratamientos profilácticos eficaces, especialmente tratamientos no quirúrgicos, que prolonguen la vida libre de cáncer para personas con FAP y personas con poliposis adenomatosa esporádica.

30

35

**3. Sumario**

40

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas, y cualesquiera otros aspectos o formas de realización expuestos en la presente memoria son proporcionados únicamente a título informativo.

45

La presente descripción proporciona métodos y composiciones útiles para prevenir cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC, en animales, incluyendo seres humanos, predispuestos a desarrollar pólipos adenomatosos. Como se describe a continuación, la presente solicitud establece regímenes de tratamiento que se cree que se unen a progastrina ("PG"), con la capacidad aparente de neutralizar la actividad biológica de PG, que son útiles en sujetos que tienen una mayor probabilidad de desarrollar, pero que aún no han desarrollado, CRC o cáncer en el tubo digestivo superior. Los diversos aspectos descritos en la solicitud se basan en parte en el descubrimiento de los solicitantes de que los anticuerpos anti-PG evitan el desarrollo de tumores gastrointestinales en un modelo de ratón de FAP. Aunque no se pretende estar atados por ninguna teoría de operación, se piensa que la unión a PG, y la interferencia con su interacción con otras proteínas en el cuerpo, evita que los pólipos adenomatosos se desarrollen en tumores malignos.

50

55

En consecuencia, en un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para prevenir cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC, en sujetos predispuestos a desarrollar pólipos adenomatosos administrando una composición que comprende un anticuerpo anti-PG. En general, los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PG. Los anticuerpos anti-PG, y sus composiciones, se pueden administrar según regímenes conocidos en la técnica para terapia a base de anticuerpos, a una dosis eficaz, es decir, una cantidad eficaz para prevenir o retrasar el cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC, en un sujeto.

60

Los sujetos adecuados para el tratamiento profiláctico anti-PG son aquellos predispuestos a desarrollar pólipos adenomatosos, incluyendo sujetos con una historia familiar de CRC, personas con FAP, y aquellos en los que se han encontrado previamente y/o extirpado pólipos adenomatosos. Típicamente, los sujetos adecuados tienen una o más mutaciones en el gen APC, que conducen a FAP o a poliposis adenomatosa esporádica. Los sujetos

65

adecuados asimismo incluyen personas que han tenido previamente una colectomía y están en mayor riesgo de desarrollar pólipos y cáncer en el tubo digestivo superior.

Los anticuerpos anti-PG de la presente descripción incluyen anticuerpos capaces de unirse a PG. En los métodos de la presente invención se puede usar cualquier anticuerpo capaz de unirse a PG, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos anti-PG policlonales y monoclonales. Preferentemente, el anticuerpo anti-PG es específico para la PG de la especie que se está tratando. Por ejemplo, se administra un anticuerpo anti-PG humana (anti-hPG) a un sujeto humano. Los anticuerpos anti-PG adecuados pueden oscilar en afinidad de unión desde al menos alrededor de 5000 nM hasta al menos alrededor de 0.001 nM, o mayor, o cualquier valor entre medias.

Los anticuerpos anti-PG descritos en la presente memoria se pueden usar en combinación con, o junto con, otros tratamientos para prevenir o retrasar el cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC. Los ejemplos no limitativos de otros tratamientos incluyen la resección quirúrgica, quimioterapia, terapia con anticuerpos, terapia de radiación, y tratamiento con un segundo agente como se describe en la presente memoria. Los anticuerpos anti-PG se pueden administrar concurrentemente con, o en un momento antes o después de, otro tratamiento.

Las composiciones adecuadas para uso en los métodos de la presente descripción pueden comprender, además de un anticuerpo anti-PG, un vehículo, excipiente, y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones se pueden formular para diversas vías de administración como se describen en la presente memoria, que comprenden vehículos, excipientes, y/o diluyentes adecuados para la vía escogida. Para el tratamiento en seres humanos y animales, las composiciones que comprenden anticuerpos anti-PG se pueden administrar usando cualquier vía adecuada de administración, tal como inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos a base de anticuerpos. Para los fines de tratamiento, las composiciones se pueden envasar en dosis unitarias para facilidad de uso.

Como se muestra en la presente memoria, los pacientes con pólipos adenomatosos múltiples tienen niveles de PG séricos elevados, mientras que los pacientes en los que se han extirpado los pólipos tienen niveles de PG séricos bajos o indetectables. Este descubrimiento proporciona nuevas herramientas poderosas para diagnosticar y monitorizar el curso de poliposis adenomatosa esporádica o familiar y su tratamiento.

En consecuencia, en otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para monitorizar la eficacia del tratamiento anti-PG en una persona predispuesta a desarrollar pólipos adenomatosos. En general, los métodos comprenden medir una concentración, o nivel, de PG en una muestra de sangre (suero, plasma, o sangre completa) procedente de la persona que recibe terapia anti-PG, durante o después de un curso de terapia anti-PG, y comparar el nivel de PG medido con un nivel de referencia de PG (por ejemplo, un nivel de PG en la persona al comienzo del tratamiento) en el que un nivel de PG medido por debajo de aquél del nivel de referencia es indicativo de eficacia de tratamiento, y un nivel de PG medido por encima de aquél del nivel de referencia es indicativo de una falta de eficacia. En algunas formas de realización, el método incluye además evaluar el número y tamaños de los pólipos en el sujeto, por ejemplo mediante endoscopia.

En todavía otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para seleccionar personas, en las que está indicada la endoscopia o el tratamiento anti-PG. Los métodos están destinados para ser llevados a cabo en personas predispuestas a desarrollar pólipos adenomatosos. En general, el método se lleva a cabo midiendo el nivel de PG en una muestra de sangre procedente de la persona, y comparando el nivel medido de PG con un nivel de referencia, en el que un nivel de PG medido mayor que el nivel de referencia indica la necesidad de endoscopia. En algunas formas de realización, un nivel de PG por encima de la referencia indica la necesidad de tratamiento anti-PG. La referencia se puede obtener de una o más muestras del individuo en un punto más temprano en el tiempo, o se puede basar en niveles de PG medidos en una población que tiene características similares a la persona.

#### 4. Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de preprogastrina humana (SEC ID n°: 100), en las que la secuencia del péptido señal está subrayada, de progastrina humana madura (SEC ID n°: 20) y de ciertos productos del procesamiento de la progastrina, incluyendo G34 (SEC ID n°: 102), G34-Gly (SEC ID n°: 103), G17 (SEC ID n°: 104), G17-Gly (SEC ID n°: 105) y CTFP (SEC ID n°: 106).

La figura 2 proporciona las secuencias polinucleotídicas y de aminoácidos de las cadenas ligera variable y pesada variable de ciertos anticuerpos monoclonales murinos anti-hPG ejemplificativos. En cada caso, las tres CDR se muestran en texto en **negrita subrayado**. Específicamente:

la figura 2A proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>H</sub> de MAb3 murino anti-hPG (SEC ID n°: 12), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 16);

la figura 2B proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>L</sub> de MAb3 murino anti-hPG (SEC ID n°: 13), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 17);

- la figura 2C proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>H</sub> de MAb4 murino anti-hPG (SEC ID n°: 14), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 18);
- 5 la figura 2D proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>L</sub> de MAb4 murino anti-hPG (SEC ID n°: 15), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 19);
- la figura 2E proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>H</sub> de MAb8 murino anti-hPG (SEC ID n°: 59), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 67);
- 10 la figura 2F proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>L</sub> de MAb8 murino anti-hPG (SEC ID n°: 63), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 71);
- la figura 2G proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>H</sub> de MAb13 murino anti-hPG (SEC ID n°: 60), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 68);
- 15 la figura 2H proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>L</sub> de MAb13 murino anti-hPG (SEC ID n°: 64), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 72);
- la figura 2I proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>H</sub> de MAb16 murino anti-hPG (SEC ID n°: 61), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 69);
- 20 la figura 2J proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>L</sub> de MAb16 murino anti-hPG (SEC ID n°: 65), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 73);
- 25 la figura 2K proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>H</sub> de MAb19 murino anti-hPG (SEC ID n°: 62), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 70); y
- la figura 2L proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V<sub>L</sub> de MAb19 murino anti-hPG (SEC ID n°: 66), y una secuencia polinucleotídica que la codifica (SEC ID n°: 74).
- La figura 3 proporciona secuencias polipeptídicas proyectadas para las cadenas pesada y ligera variables humanizadas de anticuerpos monoclonales anti-hPG seleccionados descritos en la presente memoria. En cada caso, las tres CDR se muestran en texto en **negrita subrayado**. Específicamente:
- 35 la figura 3A proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb3 humanizado (SEC ID n°: 21);
- la figura 3B proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb3 humanizado (SEC ID n°: 22);
- 40 la figura 3C proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb4 humanizado (SEC ID n°: 23);
- la figura 3D proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb4 humanizado (SEC ID n°: 24);
- 45 la figura 3E proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb8(a) humanizado (SEC ID n°: 75);
- 50 la figura 3F proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb8(a) humanizado (SEC ID n°: 76);
- la figura 3G proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb8(b) humanizado (SEC ID n°: 77);
- 55 la figura 3H proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb8(b) humanizado (SEC ID n°: 78);
- la figura 3I proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb8(c) humanizado (SEC ID n°: 79);
- 60 la figura 3J proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb8(c) humanizado (SEC ID n°: 76);
- 65 la figura 3K proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb13(a) humanizado

(SEC ID nº: 80);

la figura 3L proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb13(a) humanizado (SEC ID nº: 81);

la figura 3M proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb13(b) humanizado (SEC ID nº: 82);

la figura 3N proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb13(b) humanizado (SEC ID nº: 83);

la figura 3O proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb16(a) humanizado (SEC ID nº: 84);

la figura 3P proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb16(a) humanizado (SEC ID nº: 85);

la figura 3Q proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb16(b) humanizado (SEC ID nº: 86);

la figura 3R proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb16(b) humanizado (SEC ID nº: 87);

la figura 3S proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb16(c) humanizado (SEC ID nº: 88);

la figura 3T proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb16(c) humanizado (SEC ID nº: 89);

la figura 3U proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb19(a) humanizado (SEC ID nº: 90);

la figura 3V proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb19(a) humanizado (SEC ID nº: 91);

la figura 3W proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb19(b) humanizado (SEC ID nº: 92);

la figura 3X proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb19(b) humanizado (SEC ID nº: 93);

la figura 3Y proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>H</sub> de MAb19(c) humanizado (SEC ID nº: 94);

la figura 3Z proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V<sub>L</sub> de MAb19(c) humanizado (SEC ID nº: 95).

## 5. Descripción detallada

### 5.1 Cáncer en poliposis adenomatosa familiar y poliposis adenomatosa esporádica

La poliposis adenomatosa familiar (FAP) es una afección hereditaria rara asociada con una mutación germinal en un alelo del gen APC. Se han cartografiado numerosas mutaciones del gen APC en sujetos con FAP, dando muchas de las mutaciones como resultado una proteína truncada. Ver por ejemplo, Rustgi, 2010, "The genetics of hereditary colon cancer," *Genes & Development* 21:2525-2538; Groves *et al.*, 2002, "Duodenal cancer in patients with familial adenomatous polyposis (FAP): results of a 10-year prospective study", *Gut* 50:636-641. Estas mutaciones en APC están asociadas con FAP de gravedad variable.

FAP se caracteriza por la aparición de múltiples adenomas (pólipos) en el intestino y colon de personas afectadas, a una edad muy joven. Un subconjunto de estos pólipos se transforma en cáncer colorrectal (CRC), y los casos de CRC derivados de FAP representan aproximadamente 1% de los casos de CRC totales. Cuando hay un historial familiar de CRC, las personas sufren típicamente una evaluación genética a una edad muy temprana para detectar la presencia de una mutación en el gen APC. El seguimiento clásico en personas que se encuentra que tienen tales mutaciones comienza con la colonoscopia, resección de los pólipos cuando se encuentran pólipos, y, si los pólipos son demasiado numerosos para extirparlos endoscópicamente, la resección parcial o total del colon (colectomía). La mayoría de las personas con FAP sufrirán colectomía hacia la edad de 25 años.

Un gran porcentaje de pólipos adenomatosos esporádicos asimismo poseen mutaciones en el gen APC. Ver Rutsgi, 2010, "The genetics of hereditary colon cancer", *Genes & Development* 21:2525-2538. En ausencia de cualquier historia familiar de CRC, las personas que presentan síntomas tales como hemorragia rectal se examinan típicamente mediante colonoscopia. Las personas que se encuentre que tienen grandes números de pólipos, o en las que los pólipos reaparecen tras la resección, típicamente asimismo serán evaluadas genéticamente. Si se encuentra una mutación en el gen APC, el tratamiento recomendado es la colectomía.

Incluso tras la colectomía, las personas predispuestas a desarrollar pólipos adenomatosos tienen un mayor riesgo de desarrollar pólipos adenomatosos en la porción no resecada de sus tubos digestivos. Tales personas son seguidas con regularidad mediante endoscopia, y se evalúan en busca de adenomatosis en el tubo digestivo superior. Las personas se clasifican según la clasificación de Spigelman, que se basa en cuatro parámetros para evaluar el grado o gravedad de la adenomatosis: número de pólipos, tamaño de los pólipos, histología de los pólipos, y grado de displasia de los pólipos (crecimiento desordenado). Ver Spigelman *et al.*, 1989, "Upper gastrointestinal cancer in patients with Familial Adenomatous Polyposis", *Lancet* 2:783-785. La clasificación de Spigelman categoriza a las personas en una de cinco etapas para la poliposis duodenal, Etapa 0 a IV, en base a los cuatro parámetros, como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1				
Clasificación de Spigelman				
Puntos	Número de pólipos	Tamaño de los pólipos (mm)	Histología	Displasia
1	1-4	1-4	Tubular	Leve
2	5-20	5-10	Tubulovellosa	Moderada
3	> 20	> 10	Vellosa	Grave
Etapa I: 1-4 puntos; Etapa II: 5-6 puntos; Etapa III: 7-8 puntos; Etapa IV: 9-12 puntos.				

Un estudio durante diez años de 114 personas con FAP reveló que los pacientes de la Etapa IV de Spigelman tuvieron un riesgo de 36.4% de desarrollar cáncer duodenal, en comparación con un riesgo de 0% a 2.4% para pacientes clasificados en las Etapas 0 a III. Ver Groves *et al.*, 2002, "Duodenal cancer in patients with familial adenomatous polyposis (FAP): results of a 10 year prospective study", *Gut* 50:636-641.

Se ha mostrado previamente que aproximadamente 70% de los pacientes con CRC tienen niveles elevados de PG. Como se muestra en los ejemplos a continuación, los solicitantes han descubierto ahora que los niveles sanguíneos de PG pueden ser elevados en personas con FAP que todavía no han desarrollado CRC, así como en alrededor de 20% de pacientes que muestran poliposis adenomatosa esporádica. Aunque no se pretende estar atados por ninguna teoría de operación, se piensa que PG es parte del mecanismo mediante el cual los pólipos transitan hacia tumores malignos. Se piensa que la unión de PG mediante anticuerpos anti-PG interfiere con esta transición, como se demuestra en el modelo de ratón de FAP, APC $\Delta$ 14. El tratamiento profiláctico con anticuerpos anti-PG presenta la posibilidad de evitar o retrasar la cirugía mayor, incrementando significativamente la calidad de vida.

## 5.2 Métodos de profilaxis

La presente descripción proporciona métodos para prevenir cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC, en pacientes predispuestos a desarrollar pólipos adenomatosos. Generalmente, los métodos comprenden administrar a tales pacientes una cantidad de uno o más anticuerpos anti-PG eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. Los anticuerpos anti-PG generalmente, y los anticuerpos anti-PG específicos útiles en los métodos, se describen con detalle en una sección posterior.

El "sujeto" o "paciente" para la profilaxis 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 anticuerpo anti-PG administrado debería ser específico para la especie de animal que se esté tratando. Para el tratamiento de sujetos humanos, el anticuerpo o anticuerpos anti-PG deberían unirse específicamente a progastrina humana (denominados en la presente memoria como "anticuerpos anti-hPG", descritos con mayor detalle a continuación).

El sujeto o paciente puede ser un ser humano, tal como un paciente adulto o un paciente pediátrico. Los sujetos adecuados son personas que están predispuestas a desarrollar pólipos adenomatosos, y, como resultado, tienen una mayor probabilidad de desarrollar CRC o cáncer gastrointestinal, incluyendo personas con una historia familiar de CRC, personas en las que se detectan o se han detectado o eliminado pólipos adenomatosos, personas con FAP, personas que han tenido una colectomía para eliminar los pólipos, y personas con una mutación o mutaciones en el gen APC.

El tratamiento anti-PG se puede administrar en combinación con, o junto a, uno o más tratamientos adicionales para prevenir o retrasar el cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC. Otros tratamientos incluyen, sin limitación, tratamiento quimioterapéutico, radiación, resección quirúrgica, terapia con anticuerpos, y tratamiento con un

segundo agente, como se describe en la presente memoria. El tratamiento de combinación, como se proporciona en la presente memoria, implica la administración de al menos dos tratamientos a un paciente, el primero de los cuales es un tratamiento anti-PG con al menos un anticuerpo anti-PG, y el segundo de los cuales es un tratamiento con un agente o procedimiento terapéutico o profiláctico.

El tratamiento anti-PG se puede combinar con procedimientos quirúrgicos, tales como resección quirúrgica. Los anticuerpos anti-PG se pueden administrar a sujetos que se encuentra que tienen, o están predispuestos a desarrollar, pólipos precancerosos, tales como personas con poliposis adenomatosa familiar, en combinación con resección quirúrgica de la porción o porciones afectadas del tubo digestivo. El tratamiento anti-PG se puede iniciar antes, concurrentemente con, o después de la resección quirúrgica.

El tratamiento anti-PG asimismo se puede combinar con terapia de radiación. La terapia de radiación es el uso de radiación de alta energía procedente de rayos X, rayos gamma, neutrones, protones, y otras fuentes para exterminar células cancerosas y tumores que se reducen. La radiación puede proceder de una máquina fuera del cuerpo (terapia de radiación con haces externos), o puede proceder de material radioactivo colocado en el cuerpo cerca de las células cancerosas (terapia de radiación interna, o braquiterapia). La terapia de radiación sistémica usa una sustancia radioactiva, tal como un anticuerpo monoclonal radiomarcado, que viaja en la sangre a tejidos a lo largo del cuerpo. La terapia de radiación asimismo se puede denominar irradiación y radioterapia. Otras terapias de radiación incluyen terapia de radiación conformacional tridimensional (3D-CRT) y terapia de radiación de intensidad modulada (IMRT). Asimismo son posibles otras terapias de radiación.

Cuando el tratamiento de anticuerpo anti-PG se combina con un segundo agente, el segundo agente puede ser un agente quimioterapéutico. La quimioterapia es el uso de fármacos de tipo pequeña molécula que exterminan (citotóxicos o citocidas) o evitan el crecimiento (citostáticos) de células cancerosas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, toxinas, asimismo denominadas como citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para la viabilidad de células, agentes, y liposomas u otras vesículas que contienen compuestos quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1-deshidrotestosterona, 5-fluorouracil descabazina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleucina, agentes alquilantes, halopurinol sódico, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC), agentes anti-mitóticos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), diamino dicloro platino, antraciclinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG viva (intravesical), fosfato sódico de betametasona y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfán, leucovorina cálcica, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), clorambucilo, cisplatino, cladribina, colchicina, estrógenos conjugados, ciclofosfamida, ciclotosfamida, citarabina, citarabina, citocalasina B, citoxano, dacarbazina, dactinomicina, dactinomicina (antiguamente actinomicina), daunirubicina HCL, citrato de daunorubicina, denileucina difitox, dexrazoxano, dibromomanitol, dihidroxi antracino diona, docetaxel, mesilato de dolasetrón, doxorubicina HCL, dronabinol, L-asparaginasa de E. coli, emetina, epoetina-a, L-asparaginasa de Erwinia, estrógenos esterificados, estradiol, fosfato sódico de estramustina, bromuro de etidio, etinil estradiol, etidronato, etopósido factor citroborum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, gemcitabina HCL, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, granisetrón HCL, hidroxurea, idarrubicina HCL, ifosfamida, interferón  $\alpha$ -2b, irinotecán HCL, letrozol, leucovorina cálcica, 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 octreotida, ondansetrón HCL, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato disódico, pentostatina, pilocarpina HCL, plimicina, polifeprosán 20 con implante de carmustina, porfímero sódico, procaína, procarbazona HCL, propranolol, rituximab, sargramostim, estreptozotocina, tamoxifeno, taxol, tegafur, tenipósido, tenopósido, testolactona, tetracaína, tiotepa clorambucilo, tioguanina, tiotepa, topotecán HCL, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, y tartrato de vinorelbina.

Los anticuerpos anti-PG asimismo se pueden administrar con una combinación de agentes quimioterapéuticos. Las combinaciones ejemplificativas de agentes quimioterapéuticos 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. Asimismo son posibles otras combinaciones de agentes quimioterapéuticos descritos en la presente memoria.

En los métodos de la presente descripción se pueden usar regímenes de dosificación estándar para agentes quimioterapéuticos usados para pacientes que sufren CRC. Como es conocido en la técnica pertinente, los regímenes de quimioterapia para cáncer colorrectal usando combinaciones de diferentes agentes quimioterapéuticos se han estandarizado en ensayos clínicos. Tales regímenes son conocidos a menudo mediante 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 anti-PG asimismo se pueden usar en combinación con otros anticuerpos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales que exterminan directa o indirectamente, ralentizan o detienen el crecimiento de células cancerosas. Tales anticuerpos pueden funcionar a través de una variedad de distintos mecanismos. Por ejemplo, ciertos anticuerpos pueden marcar células cancerosas para el ataque mediante el sistema inmune del paciente vía citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) u otros mecanismos. Se cree que rituximab (Rituxan®), que se une al antígeno CD20 encontrado en células B, y edrecolomab, que se une al antígeno 17-1A, funcionan de esta manera. Otros anticuerpos se unen a y alteran o inhiben la función de antígenos que las células cancerosas requieren para la supervivencia y/o crecimiento. Se cree que un número de anticuerpos funcionan de esta manera, incluyendo, por ejemplo, cetuximab (Erbix®) y panitumumab (Vectibix®), cada uno de los cuales se une al receptor de EGF (EGFR); y bevacizumab (Avastin®), que se une al factor de crecimiento VEGF. Asimismo son posibles otros mecanismos, y en particular pueden ser posibles anticuerpos que trabajen vía uno o más mecanismos de acción. Aún otros anticuerpos se pueden conjugar a restos radioactivos o quimioterápicos y dirigirlos contra células cancerosas que expresan preferentemente antígenos reconocidos específicamente por los anticuerpos.

Los anticuerpos anti-PG asimismo se pueden administrar en combinación con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (“AINEs”). Por ejemplo, celecoxib, o 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]bencenosulfonamida, es un AINE que se ha mostrado que reduce pólipos adenomatosos en pacientes con FAP.

El anticuerpo anti-PG y un segundo agente se pueden administrar simultáneamente, sucesivamente, o separadamente. Como se usa en la presente memoria, se afirma que el anticuerpo anti-PG y el segundo agente se administran sucesivamente si se administran al paciente en el mismo día, por ejemplo durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva se puede producir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas entre ellos. Por el contrario, se afirma que el anticuerpo anti-PG y el segundo agente se administran separadamente si se administran al paciente en días diferentes, por ejemplo el anticuerpo anti-PG y el segundo agente terapéutico se pueden administrar a intervalos de 1 día, 2 días o 3 días, una semana, dos semanas, o mensualmente. En los métodos de la presente descripción, la administración del anticuerpo anti-PG de la descripción puede anteceder o seguir a la administración del segundo agente.

Como ejemplo no limitativo, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente se pueden administrar concurrentemente durante un período de tiempo, seguido de un segundo período de tiempo en el que se alterna la administración de anticuerpo anti-PG y del segundo agente.

### 5.3 Composiciones farmacéuticas y kits

Los anticuerpos anti-PG útiles en los métodos de la presente descripción se pueden formular en composiciones. Opcionalmente, las composiciones pueden comprender uno o más agentes adicionales, tales como los segundos agentes descritos anteriormente. Las composiciones se suministrarán habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración a un individuo).

Los anticuerpos anti-PG se pueden administrar a una persona mediante una variedad de vías, tal como oralmente, transdérmicamente, subcutáneamente, intranasalmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraocularmente, tópicamente, intratecalmente e intracerebroventricularmente. La vía más adecuada para la administración dependerá, en cualquier caso dado, del anticuerpo particular, del sujeto, y de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto. Los anticuerpos se pueden formular como una disolución acuosa, y se pueden administrar mediante inyección subcutánea. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso en la descripción pueden tomar una variedad amplia de formas, dependiendo, por ejemplo, de la afección a tratar o de la vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un anticuerpo anti-PG por dosis. Tal unidad puede contener, por ejemplo, 5 mg a 5 g, por ejemplo 10 mg a 1 g, o 20 a 50 mg de anticuerpo anti-PG por dosis unitaria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender anticuerpos anti-PG capaces de unirse a más de un epítopo de PG. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una combinación de anticuerpos anti-PG, cada uno capaz de unirse a un epítopo de PG diferente.

Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden preparar para el almacenamiento como formulaciones liofilizadas o disolución acuosas mezclando el anticuerpo, que tiene el grado deseado de pureza, con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales empleados típicamente en la técnica (todos los cuales se denominan en la presente memoria como “vehículos”), es decir, agentes amortiguadores, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes, y otros aditivos diversos. Ver, por ejemplo, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Tales aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.



Los agentes amortiguadores ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes a la concentración que oscila de alrededor de 2 mM a alrededor de 50 mM. Los agentes amortiguadores adecuados para uso con la presente descripción incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos, y sus sales, tales como amortiguadores de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico y citrato disódico, mezcla de ácido cítrico y citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico y citrato monosódico, etc.), amortiguadores de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico y succinato monosódico, mezcla de ácido succínico e hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico y succinato disódico, etc.), amortiguadores de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico y tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico y tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico e hidróxido sódico, etc.), amortiguadores de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico y fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico y fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico y fumarato disódico, etc.), amortiguadores de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico y gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico e hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico y gluconato potásico, etc.), amortiguador de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico y oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico e hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico y oxalato potásico, etc.), amortiguadores de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico y lactato sódico, etc.), y amortiguadores de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético y acetato sódico, mezcla de ácido acético e hidróxido sódico, etc.). Adicionalmente, se pueden usar amortiguadores de fosfato, amortiguadores de histidina, y sales de trimetilamina, tal como Tris.

Se pueden añadir conservantes para retrasar el crecimiento microbiano, y se pueden añadir en cantidades que oscilan de 0.2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para uso con la presente descripción incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, y yoduro), cloruro de hexametonio, y alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3-pentanol. Se pueden añadir isotonicantes, algunas veces conocidos como "estabilizantes", para asegurar la isotonicidad de composiciones líquidas de la presente descripción, e incluyen alcoholes de azúcar polihidroxilados, por ejemplo alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizantes se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden oscilar en función desde un agente para dar volumen hasta un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihidroxilados (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares o alcoholes de azúcar orgánicos, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol, y similares, incluyendo ciclitoles tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol,  $\alpha$ -monotioglicerol, y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 restos o menos); proteínas tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, 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 estabilizantes pueden estar presentes en el intervalo de 0.1 a 10,000 pesos por parte de peso de proteína activa.

Los tensioactivos o detergentes no iónicos (asimismo conocidos como "agentes humectantes") se pueden añadir para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica frente a la agregación inducida por agitación, lo que asimismo permite que la formulación se exponga a estrés superficial de cizallamiento sin provocar desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), poloxámeros (184, 188, etc.), polioles Pluronic, monoéteres de polioxietileno sorbitán (TWEENO-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de alrededor de 0.05 mg/ml a alrededor de 1.0 mg/ml, por ejemplo alrededor de 0.07 mg/ml a alrededor de 0.2 mg/ml.

Los excipientes diversos adicionales incluyen agentes para dar volumen (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y codisolventes.

Los anticuerpos anti-PG se pueden administrar individualmente, como mezclas de uno o más anticuerpos anti-PG, en mezcla o combinación con otros agentes útiles para prevenir CRC, o como adyuvantes a la terapia para CRC. Los ejemplos de terapias de combinación y adyuvantes adecuadas se proporcionan anteriormente.

Están comprendidos en la presente descripción kits que contienen los anticuerpos anti-PG (incluyendo conjugados de anticuerpos) de la descripción. El kit farmacéutico es un paquete que comprende la composición de anticuerpo anti-PG (por ejemplo, ya sea en forma liofilizada o como una disolución acuosa) y uno o más de los siguientes:

- un segundo agente, por ejemplo como se describe anteriormente;
- un dispositivo para administrar una composición de anticuerpo anti-PG, por ejemplo una pluma, aguja y/o jeringuilla; y
- agua o amortiguador de grado farmacéutico para resuspender el anticuerpo si el anticuerpo está en forma

liofilizada.

Cada dosis unitaria de anticuerpo anti-PG se puede envasar por separado, 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, la una o más dosis unitarias se alojan cada una en una jeringuilla o pluma.

#### 5.4 Dosis eficaces y regímenes de tratamiento

Los anticuerpos anti-PG de la presente descripción se administran al sujeto en una cantidad suficiente o eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. En el contexto de la prevención de cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC, en un sujeto predispuesto a desarrollar pólipos adenomatosos, se puede inferir un beneficio terapéutico si se logra una o más de las siguientes: una reducción o falta de incremento en el número y/o tamaño de pólipos en un sujeto; ausencia de tumores malignos, incluyendo cuando un sujeto tiene o ha tenido pólipos; reducción o falta de incremento en el nivel plásmico o sérico de PG; regresión desde una etapa más avanzada de poliposis a una etapa menos avanzada de poliposis, según la clasificación de Spigelman (por ejemplo, regresión desde la Etapa IV a la Etapa III, desde la Etapa III a la Etapa II, desde la Etapa II a la Etapa I); falta de progresión desde la poliposis de Etapa IV de Spigelman a cáncer gastrointestinal. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-PG se pueden administrar a personas (por ejemplo, sujetos humanos) en dosis eficaces.

Para que exista el beneficio terapéutico no es necesaria la prevención completa del cáncer gastrointestinal, aunque es deseable. De hecho, puesto que la mayoría de los pacientes que sufren FAP requieren cirugía mayor hacia la edad de 25 años, la ralentización de la progresión de la enfermedad, de manera que se puede retrasar la cirugía, mejora la calidad de vida. Además, cualquier retraso en el comienzo de cáncer gastrointestinal, tal como CRC, proporciona un beneficio terapéutico.

En algunos contextos, el beneficio terapéutico puede estar correlacionado con uno o más criterios de valoración sustitutos, según el conocimiento de alguien de pericia normal en la técnica. A título de ejemplo y no de limitación, las concentraciones de PG plasmáticas y/o séricas se pueden medir en un sujeto a lo largo del tiempo, siendo una reducción en los niveles de PG, o un nivel por debajo de un nivel umbral, por ejemplo por debajo de alrededor de 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, o 5 pM, indicativa de beneficio terapéutico.

El tamaño y número de los pólipos se puede medir usando técnicas endoscópicas, tales como colonoscopia, así como otros métodos conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

La unión a todas las PG libres no es necesaria para lograr la eficacia terapéutica, aunque puede ser deseable. PG libre significa PG que está disponible para unirse a un anticuerpo anti-PG. Más bien, asimismo puede ser eficaz reducir la concentración de PG libre en o alrededor de los pólipos, sistémicamente, en particular fluidos corporales, o en cualquier otra parte, hasta un grado más limitado. Los tejidos y fluidos corporales ejemplificativos en los que la concentración de PG libre se puede reducir mediante administración de composiciones de anticuerpo o anticuerpos anti-PG incluyen, pero no se limitan a, muestras de pólipos o de tumores extirpadas de un paciente, fluido ascítico, fluido de efusiones pleurales, fluido cerebroespinal, linfa, sangre, plasma, suero, y otros. La concentración de PG en uno o más de estos tejidos o fluidos corporales se puede cuantificar usando una técnica de ELISA u otras técnicas familiares para aquellos de pericia normal en la técnica.

Según el conocimiento de aquellos expertos ordinarios en la materia, la dosis de un anticuerpo anti-PG se puede titular en un paciente para reducir la concentración de PG libre en un tejido o fluido corporal de interés en un tiempo predeterminado tras la administración de al menos alrededor de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90, o 100%, o alrededor de 5%-10%, alrededor de 10%-15%, alrededor de 15%-20%, alrededor de 20%-25%, alrededor de 25%-30%, alrededor de 30%-35%, alrededor de 35%-40%, alrededor de 40%-45%, alrededor de 45%-50%, alrededor de 50%-55%, alrededor de 55%-60%, alrededor de 60%-65%, alrededor de 65%-70%, alrededor de 70%-75%, alrededor de 75%-80%, alrededor de 80%-85%, alrededor de 85%-90%, o alrededor de 90%-95%, o un porcentaje de reducción en la concentración de PG libre que oscile entre cualquiera de los valores anteriores.

La cantidad de anticuerpo anti-PG administrada dependerá de una variedad de factores, incluyendo el número y tamaño de pólipos adenomatosos encontrados en el sujeto, la forma, la vía y sitio de administración, el régimen de tratamiento (por ejemplo, si se usa un segundo agente terapéutico), la edad y estado del sujeto particular que se esté tratando, la sensibilidad del paciente a anticuerpos anti-PG. La dosis apropiada se puede determinar fácilmente por una persona experta en la técnica. Finalmente, un médico determinará las dosis apropiadas a usar. Esta dosis se puede repetir tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosis se puede alterar o reducir, según la práctica clínica normal. El régimen apropiado de dosificación y tratamiento se puede establecer monitorizando el progreso del tratamiento usando técnicas convencionales conocidas por personas expertas en la técnica.

Las dosis eficaces se pueden estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una

dosis inicial para uso en animales para lograr una concentración circulante sanguínea o sérica de anticuerpo anti-PG que sea o esté por encima de la afinidad de unión del anticuerpo por progastrina según se mide *in vitro*. El cálculo de las dosis para lograr tales concentraciones circulantes sanguíneas o séricas teniendo en cuenta la biodisponibilidad del anticuerpo particular está dentro de las capacidades de los expertos. Para una guía, refiérase el lector a Fingl y Woodbury, "General Principles" en Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Capítulo 1, última edición, Pagamonon Press, y las referencias citadas allí.

Las dosis iniciales se pueden estimar a partir de datos *in vivo*, tales como modelos de animales. Los modelos de animales útiles para evaluar la eficacia de los compuestos para retrasar o prevenir el desarrollo de tumores gastrointestinales, incluyendo tumores CRC, son bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, en los ejemplos a continuación se describe un modelo animal de FAP. Los expertos ordinarios pueden adaptar rutinariamente tal información para determinar las dosis adecuadas para la administración humana.

En formas de realización específicas, una dosis *i.v.* se puede determinar para un sujeto individual midiendo la concentración sérica o plasmática de PG de la persona unas pocas veces unos pocos días a unas pocas semanas antes del tratamiento, y calculando una cantidad de anticuerpo anti-PG que fuese saturante, es decir, una cantidad que sería suficiente para unirse a toda la PG. Como apreciarán los expertos, la cantidad de cualquier anticuerpo específico necesaria para lograr la saturación para una concentración sérica o plasmática dada de PG dependerá, en parte, de la constante de afinidad del anticuerpo particular. Los métodos para calcular cantidades saturantes para anticuerpos anti-PG específicos de interés son bien conocidos.

Para asegurar la saturación, se puede administrar una cantidad que es mayor que la cantidad saturante calculada, por ejemplo se puede administrar al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o incluso 10 veces mayor que la cantidad saturante calculada. Para los modos de administración distintos de *i.v.*, la cantidad se puede ajustar en base a la farmacocinética y biodisponibilidad, como es bien conocido en la técnica.

La dosis eficaz de un anticuerpo anti-PG de la descripción puede oscilar desde alrededor de 0.001 hasta alrededor de 75 mg/kg por administración individual (por ejemplo bolo), administraciones múltiples o administración continua (por ejemplo infusión), o para lograr una concentración sérica de 0.01-5000  $\mu\text{g/ml}$  de concentración sérica por administración individual, administraciones múltiples o administración continua, o cualquier intervalo o valor eficaz allí, dependiendo de la afección que se esté tratando, la vía de administración, y la edad, peso y condición del sujeto. En ciertas formas de realización, cada dosis puede oscilar de alrededor de 0.1 mg/kg a alrededor de 0.5 mg/kg; alrededor de 0.25 mg/kg a alrededor de 0.75 mg/kg; alrededor de 0.5 mg/kg a alrededor de 1 mg/kg; alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 2 mg/kg; alrededor de 1.5 mg/kg a alrededor de 2.5 mg/kg; alrededor de 2 mg/kg a alrededor de 3 mg/kg; alrededor de 2.5 mg/kg a alrededor de 3.5 mg/kg; alrededor de 3 mg/kg a alrededor de 4 mg/kg; alrededor de 3.5 mg/kg a alrededor de 4.5 mg/kg; alrededor de 4 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg; alrededor de 5 mg/kg a alrededor de 7 mg/kg; alrededor de 6 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg; alrededor de 7 mg/kg a alrededor de 9 mg/kg; alrededor de 8 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg; alrededor de 10 mg/kg a alrededor de 15 mg/kg; alrededor de 12.5 mg/kg a alrededor de 17.5 mg/kg; alrededor de 15 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg; alrededor de 17.5 mg/kg a alrededor de 22.5 mg/kg; alrededor de 20 mg/kg a alrededor de 25 mg/kg; alrededor de 22.5 mg/kg a alrededor de 27.5 mg/kg; alrededor de 25 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg; alrededor de 30 mg/kg a alrededor de 40 mg/kg; alrededor de 35 mg/kg a alrededor de 45 mg/kg; alrededor de 40 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg; alrededor de 45 mg/kg a alrededor de 55 mg/kg; alrededor de 50 mg/kg a alrededor de 60 mg/kg; alrededor de 55 mg/kg a alrededor de 65 mg/kg; alrededor de 60 mg/kg a alrededor de 70 mg/kg; alrededor de 65 mg/kg a alrededor de 75 mg/kg. Asimismo son posibles otros intervalos de dosificación.

La cantidad, frecuencia, y duración de la administración dependerán de una variedad de factores, tales como la edad, peso, y estado de la enfermedad del paciente. El tratamiento anti-PG está indicado en sujetos en los cuales se detectan y/o extirpan pólipos adenomatosos precancerosos, y en sujetos diagnosticados con FAP que todavía no han manifestado pólipos. En seres humanos con FAP, los pólipos comienzan a aparecer generalmente en la segunda década. El tratamiento anti-PG se puede iniciar antes o en el momento en el que se detectan los pólipos en los sujetos con FAP. Para sujetos con poliposis adenomatosa esporádica, el tratamiento anti-PG se puede iniciar en el momento en el que se detectan los pólipos. El tratamiento anti-PG asimismo se puede iniciar en sujetos que a los que se les ha extirpado al menos un pólipo, y por lo tanto están en mayor riesgo de desarrollar más pólipos y cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC.

Un régimen de tratamiento para administración puede continuar durante 2 semanas hasta indefinidamente. Opcionalmente, el régimen de tratamiento proporciona la 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 se puede repetir una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces, o más. Una cantidad eficaz de anticuerpo anti-PG se puede administrar como una única dosis o a lo largo del transcurso de un régimen de tratamiento. La duración del tratamiento anti-PG para pacientes predispuestos a desarrollar poliposis adenomatosa es preferentemente larga, por ejemplo a lo largo del curso de años, pero puede ser más corta, por ejemplo uno a varios meses, hasta un año.

### 5.5 Métodos para seleccionar pacientes para el seguimiento o tratamiento, y monitorización de los pacientes para determinar la eficacia del tratamiento

5 Sin desear estar atados por ninguna teoría particular de operación, se cree que niveles elevados de PG están asociados con la transformación de pólipos adenomatosos de benignos a malignos. Como se muestra en el ejemplo 6 a continuación, los sujetos con múltiples pólipos tienen niveles elevados de PG, mientras que los sujetos que no tuvieron pólipos tuvieron niveles bajos o indetectables de PG sérica. En base a estas observaciones, los niveles plasmáticos y/o séricos de PG se pueden usar para identificar pacientes para el seguimiento o el tratamiento, así como para monitorizar la eficacia de la profilaxis en pacientes sometidos a tratamiento.

10 La monitorización de los niveles de PG en personas con FAP o con una historia de poliposis adenomatosa esporádica es útil para identificar sujetos en los que está garantizado el seguimiento mediante colonoscopia, así como pacientes con necesidad de tratamiento anti-PG. La atención estándar para personas predispuestas a desarrollar pólipos adenomatosos es la endoscopia en un intervalo de 3 a 5 años. Este intervalo entre evaluaciones puede significar que, en ciertas personas, se hayan desarrollado numerosos pólipos o se haya instalado el cáncer para cuando se lleva a cabo la endoscopia de seguimiento. Un simple ensayo de sangre para determinar los niveles de PG se lleva a cabo fácilmente a intervalos más frecuentes, y puede identificar aquellos individuos que deberían someterse a endoscopia (por ejemplo, colonoscopia) más pronto, o que son candidatos para el tratamiento anti-PG.

20 Una persona diagnosticada con FAP, o en la que se han detectado previamente pólipos, se puede monitorizar para determinar el nivel de PG, o la concentración, en un fluido corporal, tal como sangre completa, plasma, o suero, con respecto a una referencia apropiada. En consecuencia, un nivel de PG se mide en una muestra procedente de la persona, y entonces se compara con un nivel de PG de referencia.

25 Cuando el nivel de PG en un sujeto con FAP o con una historia de poliposis adenomatosa esporádica no cambia con respecto a medidas previas en el sujeto, o es igual al nivel de referencia para la población relevante con la que se compara el sujeto, éste se puntúa como que no requiere seguimiento adicional. Por el contrario, cuando la concentración de PG está por encima de la referencia, o se observa que se eleva a lo largo de un período de tiempo en el sujeto, el sujeto es un candidato para un seguimiento posterior, incluyendo, por ejemplo, colonoscopia, y para tratamiento anti-PG.

35 Para los fines de la monitorización de la eficacia del tratamiento, los niveles de PG en sangre, plasmáticos o séricos se pueden medir en el paciente que recibe tratamiento anti-PG en puntos de tiempo específicos, y se pueden usar como una indicación de si el tratamiento es eficaz en base a si el nivel medido está por encima o por debajo de un nivel de PG de referencia. Esta información se puede usar por el personal sanitario para decidir si continúan administrando un anticuerpo anti-PG, o modifican el tratamiento. Estos métodos se pueden usar para monitorizar el tratamiento anti-PG, usado solo, o en combinación con otros tratamientos, como se describe anteriormente.

40 En algunas formas de realización de los métodos, el nivel de PG en uno o más fluidos corporales, tales como sangre completa, plasma, suero, de un paciente que recibe tratamiento de anticuerpo anti-PG se puede medir y comparar entonces con un nivel de referencia. Una disminución en la concentración a lo largo del tiempo, y/o un nivel medido por debajo de un valor umbral en un punto de tiempo particular, es indicativo de eficacia. Un incremento en la concentración a lo largo del tiempo y/o un nivel de PG por encima de la referencia es indicativo de falta de eficacia del tratamiento. Típicamente, el nivel de PG es la concentración de PG en la muestra, expresada en cantidades molares (M) o moles/litro (mol/litro).

50 El nivel de referencia puede ser un solo número, o un intervalo de números. La referencia se puede basar en una o más medidas tomadas del paciente, o se puede basar en medidas de PG en muestras procedentes de una población de personas. En algunas formas de realización de los métodos, la referencia es un nivel de PG procedente del mismo paciente, tomado en uno o más intervalos, por ejemplo antes del inicio del tratamiento anti-PG, durante el transcurso del tratamiento, o después de que se ha detenido el tratamiento. En algunas formas de realización, la referencia puede ser un nivel de PG promedio en una población de personas con características similares a aquellas de la persona que sufre la monitorización. Tales características pueden incluir, pero no se limitan necesariamente a, sexo, edad, localización de la mutación en el gen APC, etapa en la clasificación de Spigelman, historial quirúrgico, tratamiento anti-PG, u otro tratamiento. En algunas formas de realización, la referencia es un nivel de PG específico, tal como alrededor de 50 pM, alrededor de 40 pM, alrededor de 30 pM, alrededor de 20 pM, alrededor de 10 pM, alrededor de 5 pM, alrededor de 2 pM, alrededor de 1 pM, o incluso menor. En algunas formas de realización, la referencia es un intervalo.

60 Los niveles de PG se pueden medir usando técnicas familiares para aquellos de pericia normal en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, RIA y ELISA. En una forma de realización específica, los niveles de PG se pueden medir usando un ELISA de sándwich con un anticuerpo anti-PG dirigido contra el término N de progastrina y un segundo anticuerpo anti-PG dirigido contra el término C de progastrina. Los anticuerpos N- y C-terminales anti-PG ejemplificativos útiles para tal ensayo de sándwich se describen en una sección posterior. En tal ensayo, se prepara una superficie, tal como los pocillos en una placa de 96 pocillos, a la que se une una cantidad conocida de un

primer anticuerpo N-terminal o C-terminal anti-PG de "captura". Entonces se aplica una muestra de ensayo a la superficie, seguido de un período de incubación. La superficie se lava entonces, y se aplica una disolución que contiene un segundo anticuerpo anti-PG de "detección", en el que el anticuerpo de detección se une a un epítipo diferente de PG (por ejemplo, si el anticuerpo de captura es un anticuerpo C-terminal anti-PG, se usa un anticuerpo N-terminal anti-PG como el anticuerpo de detección, y viceversa). Entonces se miden los niveles de PG directamente (si, por ejemplo, el anticuerpo de detección está conjugado a un marcador detectable) o indirectamente (a través de un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo anti-PG de detección). Para este ensayo, los anticuerpos deberían usarse en exceso, de tal manera que toda la PG se una y se cuantifique. En el ejemplo 1 se proporciona un ensayo de sándwich específico para medir los niveles plasmáticos y/o séricos de PG.

Se pueden tomar múltiples medidas en intervalos diferentes, y después se pueden representar gráficamente para determinar si existe una tendencia. En un ejemplo no limitativo, los niveles de PG se pueden determinar a intervalos semanales, mensuales, o anuales, mientras que un paciente recibe anticuerpos anti-PG. Asimismo son posibles otros intervalos.

En una forma de realización que implica una ronda de terapia que usa un anticuerpo anti-PG, asimismo se pueden tomar una o más medidas durante el transcurso de la terapia, de manera que se puede estimar el efecto de los anticuerpos sobre los niveles de PG. En otra de tales formas de realización, en las que anticuerpos anti-PG residuales están presentes en un paciente durante la toma de muestras, los datos pueden mostrar una reducción en los niveles de PG, debido al secuestro de PG por los anticuerpos, seguido de una elevación, a medida que se calma este efecto, seguido de una disminución subsiguiente, si el tratamiento fue eficaz. En todavía otras formas de realización, se pueden tomar medidas tras la terapia si se estima que los anticuerpos anti-PG se han aclarado del paciente, de manera que la unión de PG por tales anticuerpos no afecta la exactitud de la medida de la concentración de PG.

Puesto que el comer incrementa habitualmente la síntesis y secreción de gastrina, asimismo puede causar incrementos transitorios en los niveles sanguíneos de PG, que pueden interferir con la medida exacta de los niveles de PG en los pacientes que están siendo monitorizados. Para evitar este efecto, particularmente cuando se va a determinar la concentración de PG en muestras de sangre, se pueden tomar muestras del paciente tras el ayuno.

#### 5.6 Anticuerpos anti-PG

Los anticuerpos útiles en los métodos descritos en la presente memoria son aquellos que se unen específicamente a progastrina con respecto a otros productos del gen de gastrina. Haciendo referencia a la figura 1, el gen de gastrina humana se traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos, denominado preprogastrina, que contiene una secuencia señal (subrayada) que se escinde, dando lugar a progastrina humana, un polipéptido de 80 aminoácidos. A su vez, la progastrina se escinde para generar un producto de 34 aminoácidos, que corresponde en secuencia a los restos 38-71 de progastrina, que entonces se extiende en su término carboxi con un resto de glicina, generando G34 extendida con glicina ("G34-Gly"). Un subproducto de esta escisión es un péptido de 6 aminoácidos, denominado el péptido de flanqueo C-terminal, o CTFP, que corresponde en secuencia a los restos 75-80 de progastrina. G34-Gly se escinde entonces adicionalmente para generar un polipéptido de 17 restos que corresponde en secuencia a los restos 55-71 de progastrina, y se denomina G17-Gly. La eliminación de las glicinas C-terminales de G34-Gly y de G17-Gly, seguido de la amidación C-terminal, produce G34 y G17, respectivamente, las cuales están amidadas C-terminalmente.

Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo es "muy específico para" hPG, o "se une muy específicamente a" hPG, si se une a progastrina de longitud completa pero no se une en absoluto a CTFP, a gastrina amidada, o a gastrina extendida con glicina; y es "específico para" hPG o "se une específicamente a" hPG si exhibe una unión al menos alrededor de 5 veces mayor de hPG que CTFP y los otros productos del gen de gastrina, según se mide en ensayos de unión estándar. En el ejemplo 2 se proporciona un ensayo ELISA específico que se puede usar para evaluar la especificidad de un anticuerpo anti-hPG particular.

Tales anticuerpos anti-hPG muy específicos y/o específicos (denominados en la presente memoria como "anticuerpos anti-hPG") pueden ser policlonales ("PAbs anti-hPG") o monoclonales ("MAbs anti-hPG"), aunque para usos terapéuticos y, en algunos casos, usos de diagnóstico u otros usos *in vitro*, se prefieren los anticuerpos monoclonales.

El epítipo unido por los anticuerpos anti-hPG no es crítico. Los anticuerpos anti-hPG útiles se pueden unir a una región N-terminal de hPG, a una región C-terminal de hPG, o a una región diferente de hPG. Recientemente, se ha descubierto que, al menos para los anticuerpos anti-hPG monoclonales, puede ser importante la selección del antígeno usado para provocar los anticuerpos anti-hPG (ver el documento WO 2011/045080). Como se describe en el documento WO 2011/045080, no todos los antígenos derivados de hPG estimulan la producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG en condiciones fisiológicas. De hecho, ciertos antígenos que se han usado para provocar con éxito anticuerpos anti-hPG policlonales, tal como hPG recombinante de longitud completa (ver, el documento WO 08/076454 de Singh) y un péptido que corresponde a

- los últimos diez aminoácidos en el extremo C-terminal de hPG (ver el documento WO 07/135542 de Hollande *et al.*), no generaron anticuerpos monoclonales. Como se señala en el documento WO 2011/045080, se han identificado secuencias N-terminal y C-terminal antigénicas dentro de la secuencia de hPG que se pueden usar para generar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG. De forma interesante, la secuencia antigénica no necesita estar limitada a regiones de la secuencia de hPG que son únicas para ella. Los antígenos peptídicos que tienen regiones de secuencia en común con otros productos del gen de gastrina, por ejemplo G17, G34 y CTFP, producen anticuerpos monoclonales que no solo se unen a hPG, sino que se unen a ella específicamente.
- 5
- 10 Los anticuerpos anti-hPG obtenibles usando un antígeno peptídico que tiene una secuencia que corresponde a una región N-terminal de hPG y/o que se unen a una región N-terminal de hPG se denominan en la presente memoria como "anticuerpos anti-PG N-terminales". Una región antigénica ejemplificativa específica de hPG que se puede usar para construir un inmunógeno adecuado para obtener tanto anticuerpos policlonales como monoclonales específicos para hPG corresponde al resto 1 a 14 de hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID n°: 25).
- 15 Los inmunógenos ejemplificativos útiles para obtener anticuerpos anti-hPG N-terminales, así como secuencias de CDR y  $V_H$  y  $V_L$  de anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales obtenidos con estos inmunógenos ejemplificativos, se proporcionan en la tabla 2A, a continuación, y en las secciones de Ejemplos:

TABLA 2A					
Anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales					
Inmunógeno	Hibridoma (Nº de depósito)	MAB	Secuencias de CDR murinas	Secuencias de V <sub>H</sub> y V <sub>L</sub> murinas	Secuencias de V <sub>H</sub> y V <sub>L</sub> humanizadas (proyectadas)
N1	43B9G11	MAB1			
N1	WE5H2G7	MAB2			
N2	6B5B11C10	MAB3	V <sub>H</sub> CDR 1.3	GYFTSYW	(SEC ID nº: 1)
			V <sub>H</sub> CDR 2.3	FYPGNSDS	(SEC ID nº: 2)
			V <sub>H</sub> CDR 3.3	TRRDSPPQY	(SEC ID nº: 3)
N2	20D2C3G2	MAB4	V <sub>L</sub> CDR 1.3	QSIVHSNGNTY	(SEC ID nº: 4)
			V <sub>L</sub> CDR 2.3	KVS	(SEC ID nº: 5)
			V <sub>L</sub> CDR 3.3	FGSHVPFT	(SEC ID nº: 6)
N2	1E9D9B6	MAB15	V <sub>H</sub> CDR 1.4	GYTFSSSW	(SEC ID nº: 7)
			V <sub>H</sub> CDR 2.4	FLPGSGST	(SEC ID nº: 8)
			V <sub>H</sub> CDR 3.4	ATDGNVDWFAY	(SEC ID nº: 9)
N2	1C8D10F5	MAB17	V <sub>L</sub> CDR 1.4	QSLVHSSGVTY	(SEC ID nº: 10)
			V <sub>L</sub> CDR 2.4	KVS	(SEC ID nº: 5)
			V <sub>L</sub> CDR 3.4	SQSTHVPPT	(SEC ID nº: 11)
N2	1A7C3F11	MAB18	V <sub>H</sub> CDR 1.16	GYFTSYW	(SEC ID nº: 39)
			V <sub>H</sub> CDR 2.16	INPSNGGT	(SEC ID nº: 43)
			V <sub>H</sub> CDR 3.16	TRGGYYPFDY	(SEC ID nº: 47)
N2	1B3B4F11	MAB19	V <sub>L</sub> CDR 1.16	QSLLDSDGKTY	(SEC ID nº: 50)
			V <sub>L</sub> CDR 2.16	LVS	(SEC ID nº: 53)
			V <sub>L</sub> CDR 3.16	WQGTHSPYT	(SEC ID nº: 57)
N2	1C11F5E8	MAB20	V <sub>H</sub> CDR 1.19	GYSITSDYA	(SEC ID nº: 40)
			V <sub>H</sub> CDR 2.19	ISFSGYT	(SEC ID nº: 44)
			V <sub>H</sub> CDR 3.19	AREVNYGDSYHFDY	(SEC ID nº: 48)
N2	Immunógeno N1 = SWKPRSQPDAPLG-Ahx-Cys-BSA, asimismo representado como (SEC ID nº: 25)-Ahx-Cys-BSA	Immunógeno N2 = SWKPRSQPDAPLG-Ahx-Cys-KLH, asimismo representado como (SEC ID nº: 25)-Ahx-Cys-KLH	V <sub>L</sub> CDR 1.19	SQHRTYT	(SEC ID nº: 51)
			V <sub>L</sub> CDR 2.19	VKKDGS	(SEC ID nº: 54)
			V <sub>L</sub> CDR 3.19	GVGDAIKGQSVFV	(SEC ID nº: 58)

En la tabla 2A, todas las secuencias de aminoácidos se representan usando la orientación convencional N->C. Para cada inmunógeno, el péptido de progestina se sintetizó con un enlazador C-terminal de un resto de ácido aminohexanoico (Ahx), seguido de un resto de cisteína (Cys), que entonces se conjugó a un portador de seroalbúmina bovina ("BSA") o de hemocianina de lapta californiana ("KLH") via el resto enlazador de Cys.

5 Los anticuerpos anti-hPG obtenibles usando un antígeno peptídico que tiene una secuencia que corresponde a una región C-terminal de hPG, y/o que se unen a una región C-terminal de hPG, se denominan en la presente memoria como "anticuerpos anti-hPG C-terminales". Una región antigénica ejemplificativa específica que se puede usar para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos anti-hPG C-terminales tanto policlonales como monoclonales corresponde a los restos 55 a 80 de hPG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEC ID n°: 27). Los inmunógenos ejemplificativos que incluyen este antígeno útiles para obtener anticuerpos anti-hPG C-terminales, así como secuencias de CDR y  $V_H$  y  $V_L$  de anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales obtenidos con estos inmunógenos ejemplificativos, se proporcionan en la tabla 2B, a continuación, y en la sección de Ejemplos:



TABLA 2B  
Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales

Inmunógeno	Hibridoma (Nº de depósito)	MAb	Secuencias de CDR murinas	Secuencias de V <sub>H</sub> y V <sub>L</sub> murinas	Secuencias de V <sub>H</sub> y V <sub>L</sub> humanizadas (proyectadas)
C1	1B4A11D11 (1-4371)	MAb5			
C1	1B6A11F2 (1-4372)	MAb6			
C1	1B11E4B11 (1-4373)	MAb7			
C1	1C10D3B9	MAb8	V <sub>H</sub> CDR 1.8 GFTFTTYA (SEC ID nº: 37)	mV <sub>H</sub> .8 (SEC ID nº: 59)	hV <sub>H</sub> .8a (SEC ID nº: 75)
			V <sub>H</sub> CDR 2.8 ISSGGTYT (SEC ID nº: 41)		hV <sub>H</sub> .8b (SEC ID nº: 77)
			V <sub>H</sub> CDR 3.8 ATQGNYSLDF (SEC ID nº: 45)		hV <sub>H</sub> .8c (SEC ID nº: 79)
			V <sub>L</sub> CDR 1.8 KSLRHTKGITF (SEC ID nº: 49)	mV <sub>L</sub> .8 (SEC ID nº: 63)	hV <sub>L</sub> .8a (SEC ID nº: 76)
			V <sub>L</sub> CDR 2.8 QMS (SEC ID nº: 52)		hV <sub>L</sub> .8b (SEC ID nº: 78)
			V <sub>L</sub> CDR 3.8 AQNLELPLT (SEC ID nº: 55)		hV <sub>L</sub> .8c (SEC ID nº: 76)
C1	1D8F5B3	MAb9			
C1	1E1C7B4	MAb10			
C1	2B4C8C8 (1-4374)	MAb11			
C1	2B11E6G4 (1-4375)	MAb12			
C1	2C6C3C7	MAb13	V <sub>H</sub> CDR 1.13 GFIFSSYG (SEC ID nº: 38)	mV <sub>H</sub> .13 (SEC ID nº: 60)	hV <sub>H</sub> .13a (SEC ID nº: 80)
			V <sub>H</sub> CDR 2.13 INTFGDRT (SEC ID nº: 42)		hV <sub>H</sub> .13b (SEC ID nº: 82)
			V <sub>H</sub> CDR 3.13 ARGTGTY (SEC ID nº: 46)		
			V <sub>L</sub> CDR 1.13 QSLDSDGKTY (SEC ID nº: 50)	mV <sub>L</sub> .13 (SEC ID nº: 64)	hV <sub>L</sub> .13a (SEC ID nº: 81)
			V <sub>L</sub> CDR 2.13 LVS (SEC ID nº: 53)		hV <sub>L</sub> .13b (SEC ID nº: 83)
			V <sub>L</sub> CDR 3.13 WQGTFFPQT (SEC ID nº: 56)		
C1	2H9F4B7	MAb14			
C2	1F11F5E10	MAb21			
C2	1F11F5G9	MAb22			
C2	1A11F2C9	MAb23			
<p>Inmunógeno C1 = KLH-Cys-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFRRSAEDEN, asimismo representado como KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 27)</p> <p>Inmunógeno C2 = DT-Cys-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFRRSAEDEN, asimismo representado como DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº: 27)</p> <p>En la tabla 2B, todas las secuencias de aminoácidos se representan usando la orientación convencional N-&gt;C. Para cada inmunógeno, el péptido de progastrina se sintetizó con un enlazador Ahx-Ahx-Cys N-terminal, que entonces se conjugó a un portador de hemocianina de lapa californiana ("KLH") o de una toxina de la difteria vía el resto enlazador de Cys.</p>					

Los epítomos específicos unidos mediante los anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos MAb1-MAb23 proporcionados en las TABLAS 2A y 2B se cartografiaron usando una técnica SPOT y barrido de alanina, como se describe en Laune *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods 267:53-70 y Laune, 1997, J. Biol. Chem. 272:30937-30944, respectivamente (ver asimismo, el ejemplo 6 del documento WO 2011/045080).

En la técnica SPOT, se generan secuencias peptídicas de 15 aminoácidos que abarcan un epítomo putativo, y se aplican sobre una membrana de nitrocelulosa, que entonces se sonda con el anticuerpo de ensayo para determinar la secuencia epitópica mínima reconocida por el anticuerpo. El barrido de alanina se usa para determinar restos en un epítomo que son críticos para la unión al anticuerpo. Cada resto en un epítomo putativo se muta, uno a uno, a una alanina, y los péptidos que contienen alanina se sondan entonces con el anticuerpo de ensayo.

Para los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales MAb1-4 y 15-20, los epítomos comprenden al menos las siguientes secuencias: DAPLG (SEC ID n°: 28), PDAPLG (SEC ID n°: 29), PRSQQP (SEC ID n°: 30), WKPRSQQP (SEC ID n°: 31), o WKPRSQQPDAPLG (SEC ID n°: 32), como se muestran en la tabla 3A a continuación.

TABLA 3A		
MAb#	Antígeno peptídico de PG: SWKPRSQQPDAPLG	SEC ID n°
MAb2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb1	PDAPLG	29
MAb3	DAPLG	28
MAb17	WKPRSQQP	31
MAb18	WKPRSQQP	31
MAb19	WKPRSQQP	31
MAb20	WKPRSQQP	31
MAb15	PRSQQP	30
MAb16	PRSQQP	30

Para los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales MAb5-7, 9-12, 14 y 21-23, los epítomos comprenden al menos las siguientes secuencias: FGRR (SEC ID n°: 33), MDFGR (SEC ID n°: 34), AEDEN (SEC ID n°: 35), y GWMDFGRR (SEC ID n°: 36), como se muestran en la tabla 3B, a continuación.

TABLA 3B		
MAb#	Antígeno peptídico de PG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEC ID n°
MAb14	GWMDFGRR	36
MAb11	MDFGR	34
MAb5	FGRR	33
MAb6	FGRR	33
MAb7	FGRR	33
MAb9	FGRR	33
MAb10	FGRR..E	33
MAb12	FGRR	33
MAb23	AEDEN	35

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

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

Las formas de realización específicas de anticuerpos anti-PG C-terminales útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria incluyen anticuerpos que se unen a un epítomo que incluye los restos 71 a 74 de hPG (SEC ID n°: 33), restos 69 a 73 de hPG (SEC ID n°: 34), restos 76 a 80 de hPG (SEC ID n°: 35), o restos 67 a 74 de hPG (SEC ID n°: 36).

Los anticuerpos anti-hPG N-terminales y C-terminales útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria, además de los proporcionados en las TABLAS 2A y 2B, se pueden identificar en ensayos de unión competitiva con los MAb1-23 ejemplificativos, o con otros anticuerpos de referencia que se unen a epítomos N- o

C-terminales, como se describirá con mayor detalle en una sección posterior.

5 Como asimismo se da a conocer en el documento WO 2011/045080, no todos los anticuerpos anti-hPG, incluso aquellos que exhiben un grado elevado de especificidad y afinidad por hPG, pueden neutralizar la actividad biológica de hPG. Por ejemplo, aunque MAb14 anti-hPG se une a hPG con una  $K_D$  de alrededor de 6 pM, no inhibió el crecimiento de células de cáncer colorrectal en un ensayo *in vitro*, mientras que otros anticuerpos monoclonales anti-hPG exhibieron actividad inhibidora significativa (ver, por ejemplo, el ejemplo 7 del documento WO 2011/045080). Aunque los anticuerpos tanto no neutralizantes como los neutralizantes que se unen específicamente a hPG son útiles para los diversos métodos de diagnóstico y de monitorización descritos en la presente memoria, los anticuerpos anti-hPG útiles para métodos terapéuticos deberían exhibir actividad neutralizante.

15 Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo anti-hPG neutralizante" es un anticuerpo anti-hPG que produce una reducción estadísticamente significativa en el número de LS174T vivas en una muestra de ensayo tratada con el anticuerpo anti-hPG, en comparación con una muestra de control tratada con un anticuerpo no específico. En el ejemplo 3 se describe un ensayo específico para evaluar la capacidad de cualquier anticuerpo anti-hPG particular para neutralizar hPG. Se cree que aquellos anticuerpos anti-hPG que exhiben una reducción de al menos alrededor de 50% en el número de células vivas en este ensayo son especialmente útiles en métodos para prevenir cáncer gastrointestinal, incluyendo CRC, aunque se espera que los anticuerpos anti-hPG que exhiben menores niveles de actividad neutralizante, por ejemplo una reducción estadísticamente significativa de 40%, 30%, 20%, 15%, o incluso 10%, en el número de células vivas en este ensayo, proporcionen beneficios terapéuticos.

25 En consecuencia, en algunas formas de realización, por ejemplo formas de realización terapéuticas, los anticuerpos anti-hPG útiles son neutralizantes. Como se describe en el documento WO 2011/045080, la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG no depende del epítipo, ya que tanto los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales como C-terminales exhibieron actividad neutralizante en ensayos con células de cáncer colorrectal que poseen una mutación en el gen APC. De este modo, en algunas formas de realización específicas, los anticuerpos anti-hPG neutralizantes son anticuerpos anti-hPG neutralizantes N-terminales. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-hPG neutralizantes son anticuerpos anti-hPG neutralizantes C-terminales.

30 La afinidad de cualquier anticuerpo anti-hPG específico no es crítica. Sin embargo, para algunos usos, se pueden preferir anticuerpos que exhiben afinidades de al menos alrededor de 1

35  $\mu$ M. Para usos terapéuticos, puede ser deseable una afinidad de al menos alrededor de 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM, o incluso mayor. Las afinidades medidas de los anticuerpos monoclonales anti-hPG identificados en las TABLAS 2A y 2B oscilan desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-12}$  M, como se señala en la tabla 4, a continuación:

TABLA 4	
MAb#	Afinidad ( $K_D$ medida)
MAb1	2.5 $\mu$ M ( $2.5 \times 10^{-6}$ M)
MAb2	185 nM ( $1.85 \times 10^{-7}$ M)
MAb3	6.4 nM ( $6.4 \times 10^{-9}$ M)
MAb4	3.5 nM ( $3.5 \times 10^{-9}$ M)
MAb5	13 pM ( $1.30 \times 10^{-11}$ M)
MAb6	0.6 nM ( $6.38 \times 10^{-10}$ M)
MAb7	58 pM ( $5.84 \times 10^{-11}$ M)
MAb8	0.1 nM ( $1.08 \times 10^{-10}$ M)
MAb10	3.6 nM ( $3.62 \times 10^{-9}$ M)
MAb11	0.3 nM ( $3.12 \times 10^{-10}$ M)
MAb12	0.4 nM ( $4.43 \times 10^{-10}$ M)
MAb13	0.6 nM ( $6.12 \times 10^{-10}$ M)
MAb14	6.8 pM ( $6.86 \times 10^{-12}$ M)
MAb15	0.2 nM ( $2.11 \times 10^{-10}$ M)
MAb16	0.2 nM ( $2.78 \times 10^{-10}$ M)
MAb17	8.3 nM ( $8.29 \times 10^{-9}$ M)
MAb18	1.2 nM ( $1.24 \times 10^{-9}$ M)
MAb19	0.7 nM ( $7.79 \times 10^{-10}$ M)
MAb20	0.2 nM ( $2.47 \times 10^{-10}$ M)
MAb21	3.9 nM ( $3.90 \times 10^{-9}$ M)
MAb22	5 nM ( $4.94 \times 10^{-9}$ M)
MAb23	0.4 $\mu$ M ( $3.99 \times 10^{-7}$ M)

Un anticuerpo monoclonal anti-PG que tiene una afinidad especialmente adecuada para una aplicación deseada particular se puede seleccionar fácilmente de entre éstos, o se puede generar o diseñar usando los diversos inmunógenos, secuencias de regiones determinantes de la complementariedad (CDR), secuencias de las cadenas pesada variable ( $V_H$ ) y ligera variable ( $V_L$ ) de anticuerpos anti-hPG descritos en la presente memoria. La afinidad de cualquier anticuerpo monoclonal anti-PG particular se puede determinar usando técnicas bien conocidas en la técnica, o descritas en la presente memoria, tales como, por ejemplo, ELISA, calorimetría de titulación isotérmica (ITC), BIAcore, o ensayos de polarización fluorescente. En el ejemplo 4 se proporciona un ensayo específico.

Como se señala en las TABLAS 2A y 2B, se han identificado varios anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales y C-terminales. Todos estos anticuerpos son específicos para hPG, y, con la excepción de MAb14, todos ellos mostraron actividad neutralizante en ensayos con células de cáncer colorrectal. Varios de los hibridomas útiles para obtener los anticuerpos se depositaron el 6 de octubre de 2010 con la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) según el Tratado de Budapest. Los nombres designados de los hibridomas que producen MAb1-23 anti-hPG, y los números de registro de depósito de esos hibridomas depositados, se proporcionan en las TABLAS 2A y 2B. Además, para varios de los anticuerpos, se han determinado las secuencias de aminoácidos de sus cadenas pesadas variables ( $V_H$ ), cadenas ligeras variables ( $V_L$ ), regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de  $V_L$  y CDR de  $V_H$ . Estas secuencias de aminoácidos, y la nomenclatura abreviada usada para referenciarlas a lo largo de la descripción, asimismo se proporcionan en las TABLAS 2A y 2B. De forma breve, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera murinos se denominan 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 las cadenas ligera variable y pesada variable de MAb3 anti-hPG, respectivamente. De forma similar, los dominios variables de las cadenas pesada y ligera humanos se denominan en la presente memoria como  $hV_H$  y  $hV_L$ , seguido del número del anticuerpo monoclonal correspondiente. Las tres CDR de las cadenas pesadas variables y las tres CDR de las cadenas ligera variables se refieren como  $V_H$  CDR 1, 2, o 3, y  $V_L$  CDR 1, 2, o 3, respectivamente, seguido del número del anticuerpo monoclonal anti-hPG específico. Por ejemplo,  $V_H$  CDR1 de MAb3 se representa  $V_H$  CDR 1.3 y  $V_L$  CDR 1 de MAb3 se representa  $V_L$  CDR 1.3.  $V_H$  CDR 2 de MAb3 se representa  $V_H$  CDR 2.3, y  $V_L$  CDR 2 de MAb3 se representa  $V_L$  CDR 2.3.

Se espera que las CDR y/o cadenas  $V_H$  y  $V_L$  correspondientes de los anticuerpos monoclonales anti-hPG que se unen aproximadamente a los mismos epítopos se puedan intercambiar para producir nuevos anticuerpos monoclonales anti-hPG útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria. Por ejemplo, como se señala anteriormente, los anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos MAb5 y MAb6 se unen al mismo epítipo. Se puede diseñar un anticuerpo monoclonal anti-hPG que incluya, en su cadena  $V_L$ , diversas combinaciones de las  $V_L$  CDR de estos dos anticuerpos, y/o, en su cadena  $V_H$ , diversas combinaciones de las  $V_H$  CDR de estos dos anticuerpos. Como ejemplo no limitativo específico para ilustrar las diversas combinaciones posibles, tal anticuerpo podría incluir en su cadena  $V_L$ , CDR 1 y 2 de MAb5 ( $V_L$  CDR 1.5 y  $V_L$  CDR 2.5, respectivamente) y CDR 3 de MAb6 ( $V_L$  CDR 3.6), y en su cadena  $V_H$ , CDR 1 de MAb6 ( $V_H$  CDR 1.6) y CDR 2 y 3 de MAb5 ( $V_H$  CDR 2.5 y  $V_H$  CDR 3.5, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de las CDR de anticuerpos (asimismo conocidas como regiones hipervariables) producidos por hibridomas que se han depositado se pueden obtener usando medios convencionales.

Como es conocido en la técnica, la posición/frontera de los aminoácidos que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones dentro de un dominio variable se pueden ver como posiciones hipervariables híbridas, por cuanto esas posiciones se pueden considerar que están dentro de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios, mientras que se pueden considerar que están fuera de una región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Una o más de estas posiciones asimismo se pueden encontrar en regiones hipervariables extendidas. Los anticuerpos anti-PG descritos en la presente memoria pueden contener modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, en gran parte adoptando una configuración de lámina B, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina B. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones FR en el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión diana de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, 1987, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md.). Como se usa en la presente memoria, la numeración de los restos de aminoácidos de inmunoglobulinas se realiza según el sistema de numeración de restos de aminoácidos de inmunoglobulinas de Kabat *et al.*, excepto que se indique de otro modo.

Haciendo referencia a la tabla 2A, las formas de realización específicas de anticuerpos anti-hPG N-terminales útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

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

(b) anticuerpos que tienen  $V_L$  CDR y  $V_H$  CDR que corresponden en secuencia a las  $V_L$  y  $V_H$  CDR de MAb1,

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

(c) anticuerpos en los que:

- 5 (i) V<sub>L</sub> CDR 1 se selecciona de QSIVHSNGNTY ("V<sub>L</sub> CDR 1.3"; SEC ID n°: 4), QSLVHSSGVTY ("V<sub>L</sub> CDR 1.4"; SEC ID n°: 10), QSLLDSDGKTY ("V<sub>L</sub> CDR 1.16"; SEC ID n°: 50), y SQHRITYT ("V<sub>L</sub> CDR 1.19"; SEC ID n°: 51);
- 10 (ii) V<sub>L</sub> CDR 2 se selecciona de KVS ("V<sub>L</sub> CDR 2.3" o "V<sub>L</sub> CDR 2.4"; SEC ID n°: 5), LVS ("V<sub>L</sub> CDR 2.16"; SEC ID n°: 53), y VKKDGS ("V<sub>L</sub> CDR 2.19"; SEC ID n°: 54);
- 15 (iii) V<sub>L</sub> CDR 3 se selecciona de FQGSHVPFT ("V<sub>L</sub> CDR 3.3"; SEC ID n°: 6), SQSTHVPPT ("V<sub>L</sub> CDR 3.4"; SEC ID n°: 11), WQGTHSPYT ("V<sub>L</sub> CDR 3.16"; SEC ID n°: 57), y GVGDAIKGQSVFV ("V<sub>L</sub> CDR 3.19"; SEC ID n°: 58);
- (iv) V<sub>H</sub> CDR 1 se selecciona de GYIFTSYW ("V<sub>H</sub> CDR 1.3"; SEC ID n°: 1), GYTFSSSW ("V<sub>H</sub> CDR 1.4"; SEC ID n°: 7), GYTFTSYY ("V<sub>H</sub> CDR 1.16"; SEC ID n°: 39), y GYSITSDYA ("V<sub>H</sub> CDR 1.19"; SEC ID n°: 40);
- 20 (v) V<sub>H</sub> CDR 2 se selecciona de FYPGNSDS ("V<sub>H</sub> CDR 2.3"; SEC ID n°: 2), FLPGSGST ("V<sub>H</sub> CDR 2.4"; SEC ID n°: 8), INPSNGGT ("V<sub>H</sub> CDR 2.16"; SEC ID n°: 43), y ISFSGYT ("V<sub>H</sub> CDR 2.19"; SEC ID n°: 44); y
- 25 (vi) V<sub>H</sub> CDR 3 se selecciona de TRRDSPQY ("V<sub>H</sub> CDR 3.3"; SEC ID n°: 3), ATDGNYDWFAY ("V<sub>H</sub> CDR 3.4"; SEC ID n°: 9), TRGGYYPFDY ("V<sub>H</sub> CDR 3.16"; SEC ID n°: 47), y AREVNYGDSYHFDY ("V<sub>H</sub> CDR 3.19"; SEC ID n°: 48);
- (d) anticuerpos que tienen un V<sub>L</sub> que corresponde en secuencia al V<sub>L</sub> de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20, y un V<sub>H</sub> que corresponde en secuencia al V<sub>H</sub> de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20; y
- 30 (e) anticuerpos que tienen un V<sub>L</sub> y un V<sub>H</sub> que corresponden en secuencia a los V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20.

Haciendo referencia a la tabla 2B, las formas de realización específicas de anticuerpos anti-hPG C-terminales útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

- 35 (a) anticuerpos que tienen V<sub>L</sub> CDR que corresponden en secuencia a las V<sub>L</sub> CDR de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23 y V<sub>H</sub> CDR que corresponden en secuencia a las V<sub>H</sub> CDR de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23;
- 40 (b) anticuerpos que tienen V<sub>L</sub> CDR y V<sub>H</sub> CDR que corresponden en secuencia a las V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> CDR de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23;
- 45 (c) anticuerpos en los que:
- (i) V<sub>L</sub> CDR 1 se selecciona de KSLRHTKGITF ("V<sub>L</sub> CDR 1.8"; SEC ID n°: 49) y QSLLDSDGKTY ("V<sub>L</sub> CDR 1.13"; SEC ID n°: 50);
- 50 (ii) V<sub>L</sub> CDR 2 se selecciona de QMS ("V<sub>L</sub> CDR 2.8"; SEC ID n°: 52) y LVS ("V<sub>L</sub> CDR 2.13"; SEC ID n°: 53);
- (iii) V<sub>L</sub> CDR 3 se selecciona de AQNLELPLT ("V<sub>L</sub> CDR 3.8"; SEC ID n°: 55) y WQGTHFPQT ("V<sub>L</sub> CDR 3.13"; SEC ID n°: 56);
- 55 (iv) V<sub>H</sub> CDR 1 se selecciona de GFTFTTYA ("V<sub>H</sub> CDR 1.8"; SEC ID n°: 37) y GFIFSSYG ("V<sub>H</sub> CDR 1.13"; SEC ID n°: 38);
- (v) V<sub>H</sub> CDR 2 se selecciona de ISSGGTYT ("V<sub>H</sub> CDR 2.8"; SEC ID n°: 41) y INTFGDRT ("V<sub>H</sub> CDR 2.13"; SEC ID n°: 42); y
- 60 (vi) V<sub>H</sub> CDR 3 se selecciona de ATQGNYSLDF ("V<sub>H</sub> CDR 3.8"; SEC ID n°: 45) y ARG TGTY ("V<sub>H</sub> CDR 3.13"; SEC ID n°: 46);
- 65 (d) anticuerpos que tienen un V<sub>L</sub> que corresponde en secuencia al V<sub>L</sub> de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23, y un V<sub>H</sub> que corresponde en secuencia al V<sub>H</sub> de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23; y

- (e) anticuerpos que tienen  $V_L$  y un  $V_H$  que corresponden en secuencia al  $V_L$  y  $V_H$  que corresponden en secuencia al  $V_L$  y  $V_H$  de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23.

5

Como apreciarán los expertos, los anticuerpos anti-hPG útiles en los métodos de diagnóstico pueden ser de cualquier origen, incluyendo, por ejemplo, mamífero (por ejemplo, humano, primate, roedor, cabra o conejo), no mamífero, o de naturaleza quimérica (derivado de más de una especie de origen). Los anticuerpos adecuados para usos terapéuticos en animales, incluyendo seres humanos, derivan preferentemente de la misma especie destinada a ser tratada, o se han modificado o diseñado para que sean no inmunogénicos o tengan una inmunogenicidad reducida en el animal que se esté tratando. Una clase específica de anticuerpos anti-hPG útil para usos terapéuticos en seres humanos es la clase de anticuerpos humanizados, explicada con mayor detalle a continuación. Los anticuerpos anti-hPG útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria asimismo pueden ser, o derivar, de cualquier isotipo, incluyendo, por ejemplo, IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) o IgM. Los anticuerpos anti-hPG diseñados para usos terapéuticos son preferentemente del isotipo IgG.

10

15

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-hPG útiles para métodos terapéuticos descritos en la presente memoria están humanizados. En general, los anticuerpos humanizados comprenden sustancialmente todos de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de armazón estructural son aquellas de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana, y se pueden denominar como "injertados con CDR". El anticuerpo humanizado asimismo puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Los métodos para humanizar anticuerpos, incluyendo métodos para diseñar anticuerpos humanizados, son bien conocidos 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<sup>os</sup> 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen *et al.*; documento EP239400; publicación PCT WO 91/09967; patente US n<sup>o</sup> 5.225.539; documentos EP592106; EP519596; Padlan, 1991, *Mol. Immunol.* 28:489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Prot. Eng.* 7:805-814; Roguska *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:969-973; y patente US n<sup>o</sup> 5.565.332.

20

25

30

Las versiones humanizadas de anticuerpos que tienen secuencias de CDR que corresponden a las CDR de anticuerpos anti-hPG no humanos, incluyendo, a título de ejemplo y no de limitación, los diversos anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales proporcionados en la tabla 2A y los diversos anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales proporcionados en la tabla 2B, se pueden obtener usando estos métodos bien conocidos. Las secuencias proyectadas para las cadenas  $V_L$  y  $V_H$  humanizadas de anticuerpos anti-hPG seleccionados se proporcionan en las TABLAS 2A y 2B. Los ejemplos específicos de anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que comprenden:

35

40

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

45

50

55

60

65

Como reconocerán los expertos, los anticuerpos anti-hPG que tienen propiedades de unión específicas, tales como la capacidad para unirse a un epítipo específico de interés, se pueden obtener fácilmente usando los diversos antígenos e inmunógenos descritos en la presente memoria, y evaluando su capacidad para competir por la unión a hPG con un anticuerpo de referencia de interés. En tal ensayo de competición se puede utilizar, como anticuerpo de referencia, cualquiera de los anticuerpos anti-hPG descritos en la presente memoria. En el ejemplo 5 se proporciona un ensayo específico útil para evaluar la capacidad de un anticuerpo para competir por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado de interés.

A la hora de realizar un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo anti-hPG de referencia y cualquier anticuerpo de ensayo (independientemente de la especie o isotipo), en primer lugar se puede marcar la referencia con un marcador detectable ya sea directamente, tal como, por ejemplo, un radioisótopo o fluoróforo, o indirectamente, tal como, por ejemplo, biotina (detectable vía la unión con estreptavidina marcada fluorescentemente) o una enzima (detectable vía una reacción enzimática), para permitir la identificación subsiguiente. En este caso, un anticuerpo anti-hPG de referencia marcado (en concentraciones fijas o en concentraciones crecientes) se incuba con una cantidad conocida de hPG, formando un complejo hPG:anticuerpo anti-hPG marcado. El anticuerpo de ensayo no marcado se añade entonces al complejo. Se mide la intensidad del marcador complejado. Si el anticuerpo de ensayo compite por hPG con el anticuerpo anti-hPG de referencia marcado mediante la unión a un epítipo que solapa, la intensidad del marcador complejado disminuirá con respecto a un experimento de control llevado a cabo en ausencia de anticuerpo de ensayo.

Se conocen numerosos métodos para llevar a cabo ensayos de competición de unión, y se pueden adaptar para producir resultados comparables al ensayo descrito anteriormente y en el ejemplo 5.

Se considera que un anticuerpo compite por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia, y de este modo se considera que se une aproximadamente al mismo epítipo o a un epítipo que solapa de hPG como el anticuerpo anti-hPG de referencia, si reduce la unión del anticuerpo anti-hPG de referencia a hPG en un ensayo de unión competitiva, y específicamente el ensayo de unión competitiva del ejemplo 5, en al menos 50%, a una concentración de anticuerpo de ensayo en el intervalo de 0.01-100  $\mu\text{g/ml}$  (por ejemplo, 0.01  $\mu\text{g/ml}$ , 0.08  $\mu\text{g/ml}$ , 0.4  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  o 100  $\mu\text{g/ml}$ , u otra concentración dentro del intervalo señalado), aunque pueden ser deseables mayores niveles de reducción, por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90% o incluso 100%.

Los expertos apreciarán que en algunos contextos, por ejemplo contextos de diagnóstico y de monitorización, puede ser deseable marcar los anticuerpos anti-PG. Tales marcadores son útiles para la detección y cuantificación. Los marcadores adecuados son bien conocidos en la técnica, y pueden ser "directos", por cuanto son directamente observables o detectables (por ejemplo, fluoróforos o radioisótopos), o "indirectos", por cuanto interaccionan con algo más que produce una señal observable o detectable (por ejemplo, una enzima que actúa sobre un sustrato para producir una señal detectable, o una molécula de unión tal como biotina que se une a una molécula de estreptavidina marcada). En la técnica se conocen numerosos sistemas de marcaje, así como medios para marcar anticuerpos con ellos, y se contemplan para uso en la presente memoria.

Aunque los diversos anticuerpos anti-hPG útiles en los métodos descritos en la presente memoria se han ejemplificado con anticuerpos de longitud completa, los expertos apreciarán que asimismo se pueden usar fragmentos de unión, o anticuerpos sustitutos diseñados o derivados de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de unión. Los fragmentos, sustitutos, etc., adecuados incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, vIgG, scFv y susticuerpos. Excepto que se especifique de otro modo, el término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, pretende incluir todas las formas de anticuerpos y moléculas sustitutas "similares a anticuerpos", incluyendo anticuerpos monocatenarios, susticuerpos y fragmentos de unión. Los anticuerpos que tienen estructuras típicas de anticuerpos de origen natural se denominan en la presente memoria como "anticuerpos nativos".

#### 5.7 Métodos para producir anticuerpos anti-PG

Los anticuerpos anti-PG, útiles en los métodos descritos en la presente memoria, se pueden obtener usando métodos estándar bien conocidos. Para expresar anticuerpos anti-PG útiles en los métodos descritos en la presente memoria, se insertan ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud completa o parcial en vectores de expresión, de manera que los genes estén enlazados operativamente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, la expresión "enlazados operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traduccional en el vector sirven a su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se escogen para que sean compatibles con la célula hospedante de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados, o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios de un fragmento y vector del gen del anticuerpo, o ligación del extremo

romo si no hay sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de las cadenas ligera o pesada del anticuerpo anti-PG, el vector de expresión puede portar ya secuencias de la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo anti-PG en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican la región constante de cadena pesada y la región constante de cadena ligera, respectivamente, de manera que el segmento  $V_H$  está enlazado operativamente al segmento o segmentos  $C_H$  en el vector, y el segmento  $V_L$  está enlazado operativamente al segmento  $C_L$  en el vector. Adicionalmente, o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula hospedante. El gen de las cadenas de anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal se enlaza en el marco al término amino del gen de las cadenas de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal procedente de una proteína no inmunoglobulínica).

Además de los genes de las cadenas de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la descripción portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de las cadenas de anticuerpo en una célula hospedante. La expresión "secuencia reguladora" está destinada a incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de las cadenas de anticuerpo. Tales 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 las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células hospedantes de mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión proteica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador CMV), Virus 40 del Simio (SV40) (tal como el promotor/potenciador SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), y poliovirus. Para una descripción adicional de elementos reguladores víricos, y sus secuencias, véanse, por ejemplo, la patente US n° 5.168.062 de Stinski, la patente US n° 4.510.245 de Bell *et al.*, y la patente US n° 4.968.615 de Schaffner *et al.*

Además de los genes de las cadenas de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedantes (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedantes en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes US n°s 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tal como G418, puromicina, blasticidina, higromicina o metotrexato, en una célula hospedante en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células hospedantes DHFR<sup>-</sup> con selección/amplificación mediante metotrexato), y el gen neo (para la selección mediante G418). Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula hospedante mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden englobar una variedad amplia de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedante procarionta o eucariota, por ejemplo electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y similares.

Es posible expresar los anticuerpos descritos en la presente memoria en células hospedantes procariontas o eucariotas. En ciertas formas de realización, la expresión de los anticuerpos se lleva a cabo en células eucariotas, por ejemplo células hospedantes de mamíferos, para la secreción óptima de un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Las células hospedantes de mamíferos ejemplificativas para expresar los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células DHFR<sup>-</sup>CHO, 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 NS0, células COS, células 293, y células SP2/0. Cuando se introducen en células hospedantes de mamíferos vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedantes durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedantes, o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células hospedantes. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándar. Las células hospedantes asimismo se pueden usar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos  $F_{ab}$  o moléculas  $scF_v$ . Se entiende que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transferir una célula hospedante con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo anti-PG descrito en la presente memoria.

La tecnología de ADN recombinante asimismo se puede usar para eliminar parte o todo el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligera o pesada que no es o no sean necesarias para la unión a PG. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncado asimismo son útiles en los métodos descritos en la presente memoria.



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

Los anticuerpos anti-PG asimismo se pueden producir mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los métodos descritos en *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Los anticuerpos variantes asimismo se pueden generar usando una plataforma libre de células (ver, por ejemplo, *Chu et al.*, 2001, *Biochemia No. 2* (Roche Molecular Biologicals)).

Una vez que se ha producido un anticuerpo anti-PG mediante expresión recombinante o por medios sintéticos, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula inmunoglobulínica, por ejemplo mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad por PG tras selección con Proteína A o Proteína G, y cromatografía de columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos anti-PG o sus fragmentos de unión se pueden fusionar a secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

## 6. Ejemplos

### 6.1 Ejemplo 1: Cuantificación de niveles plasmáticos o séricos de PG

Los niveles plasmáticos y/o séricos de PG se pueden determinar convenientemente usando el siguiente ensayo. Se revisten placas de microtitulación de 96 pocillos con una cantidad entre 0.5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-hPG C-terminal, por ejemplo anticuerpo policlonal anti-hPG C-terminal de conejo, o un anticuerpo anti-hPG C-terminal descrito en la presente memoria, y entonces se incuban toda la noche. Las placas se lavan entonces tres veces en PBS-Tween (0.05%) y se bloquean con 2% (p/v) de leche deshidratada no grasa en PBS-Tween (0.05%). De forma separada, se preparan muestras de ensayo, muestras de control (muestras en blanco o muestras séricas o plasmáticas PG negativas), y entre alrededor de 5 pM ( $0.5 \times 10^{-11}$  M) y alrededor de 0.1 nM ( $1 \times 10^{-10}$  M) de un patrón de referencia de hPG (hPG liofilizada diluida en plasma o suero PG negativo), en un diluyente apropiado (por ejemplo, PBS-Tween 0.05%). Las muestras se incuban en las placas revestidas durante un tiempo entre 2 y 4 horas a 37°C, o, como alternativa, entre 12 y 16 horas a 21°C. Tras la incubación, las placas se lavan tres veces con PBS-Tween (0.05%) y se incuban con entre 0.001 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de un anticuerpo anti-hPG N-terminal, por ejemplo un anticuerpo anti-hPG N-terminal policlonal o un anticuerpo anti-hPG monoclonal N-terminal como se describe en la presente memoria, acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (ver, *Nakane et al.*, 1974, *J. Histochem. Cytochem.* 22(12):1084-1091) durante 30 minutos a 21°C. Las placas se lavan entonces tres veces en PBS-Tween (0.05%), y se añade sustrato de HRP durante 15 minutos a 21°C. La reacción se detiene añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico 0.5M, y se toma una medida de la densidad óptica a 405 nm. Los niveles de hPG de las muestras de ensayo se determinan mediante comparación con una curva patrón construida para las medidas derivadas del patrón de referencia de hPG.

### 6.2 Ejemplo 2: Ensayo ELISA para evaluar la especificidad de anticuerpos anti-hPG

La especificidad de los anticuerpos anti-hPG se puede determinar convenientemente usando un ensayo ELISA como sigue. Placas de 96 pocillos se incuban toda la noche a 4°C con una concentración o concentraciones apropiadas de polipéptido de ensayo (por ejemplo, 25 y 50 ng de PG humana recombinante, y 50 y 250 ng de CTFP u otros productos génicos derivados de gastrina) en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), después de lo cual los pocillos se lavan tres veces con disolución de lavado (PBS y 0.1% de Tween-20), y entonces se incuban durante 2 horas a 22°C con 100  $\mu\text{l}$  de disolución de bloqueo (PBS, 0.1% de Tween-20, 0.1% de seroalbúmina bovina o hidrolizado de caseína) por pocillo. Tras el bloqueo, los pocillos se lavan tres veces, y se añade el anticuerpo a ensayar (anticuerpo de ensayo). Se añaden a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpo de ensayo (a 0.3 hasta 1 ng/ml) en PBS y 0.1% de Tween-20. Las placas se incuban entonces durante 2 horas a 22°C, tras lo cual se descarta la disolución del anticuerpo de ensayo y se sustituye, tras una etapa de lavado (3X 100  $\mu\text{l}$  de disolución de lavado, como se señala anteriormente), por disolución de bloqueo que contiene un anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-IgG de ratón (Fc) de cabra acoplado a peroxidasa de rábano picante. Tras una incubación durante 1 hora con anticuerpo secundario, se añaden a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de disolución de sustrato (por ejemplo, Fast OPD, o dihidrocloruro de O-fenilendiamina, disponible de Sigma-Aldrich Co., preparado según las direcciones del fabricante), y se incuban en la oscuridad durante 20 minutos a 22°C. La reacción se detiene añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico 4N, y la cantidad de sustrato catalizado se determina midiendo la densidad óptica (O.D.) a 492 nm. La conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo (de ensayo) primario unido al antígeno. Los experimentos se realizaron por duplicado, y las medidas de la OD se representaron gráficamente como una función de la concentración del antígeno. Los anticuerpos de ensayo se clasificaron como específicos para PG si la O.D. medida está entre 0.2 y 1.5 para hPG, y no hay ninguna señal estadísticamente

significativa por encima del fondo con CTFP o cualquiera de los otros péptidos derivados del gen de gastrina, en el que el fondo es la señal promedio de los pocillos de control que contienen solamente PBS.

### 6.3 Ejemplo 3: Ensayo para evaluar la actividad neutralizante de anticuerpos anti-hPG

Un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo anti-hPG específico es neutralizante se puede llevar a cabo como sigue. Se siembran células LS174T en 6 pocillos de una placa de 6 pocillos, a aproximadamente 50,000 células por pocillo. Las células se tratan entonces a intervalos de 12 horas durante 48 horas con el anticuerpo anti-hPG de ensayo o con un anticuerpo de control, a concentraciones de anticuerpo de alrededor de 5  $\mu\text{g/ml}$ . Un anticuerpo de ensayo se define como neutralizante en el ensayo, si el número de células tratadas con el anticuerpo de ensayo muestra una reducción estadísticamente significativa de al menos 10% en el número de células supervivientes en comparación con el número de células tratadas con un anticuerpo no específico de control, usando una prueba de Mann-Whitney de dos colas (considerándose las diferencias como significativas cuando  $p < 0.05$ ). Los números de células totales se corrigen para el número de células al comienzo del período de tratamiento, denominado  $T_0$ .

### 6.4 Ejemplo 4: Ensayo para evaluar la afinidad de un anticuerpo anti-hPG

Las constantes de afinidad de los anticuerpos anti-hPG se pueden medir usando la Técnica Proteon (BioRad), según Nahshol *et al.*, 2008, *Analytical Biochemistry* 383:52-60. De forma breve, para anticuerpos murinos anti-PG, en primer lugar se reviste un anticuerpo anti-IgG de ratón (50  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre un chip sensor, asegurándose de que la señal detectada por el chip tras la inyección del anticuerpo cae entre 10,000 y 11,500 unidades de respuesta (RU). El anticuerpo anti-hPG murino de interés (anticuerpo de ensayo) se inyecta entonces (a una concentración típica de 30  $\mu\text{g/ml}$ ). Si el anticuerpo de ensayo se une suficientemente, se observará una señal adicional de al menos 500 RU. Entonces se obtiene un transcurso de tiempo de la unión entre el anticuerpo de ensayo y hPG inyectando concentraciones variables de hPG, por ejemplo 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, y 12.5 nM, y detectando el nivel de asociación. Típicamente, existen varios canales para ensayar anticuerpos múltiples en paralelo en un único experimento, haciendo posible evaluar la unión de un solo anticuerpo de ensayo a diferentes concentraciones de hPG en paralelo. Un canal se debería inyectar con un anticuerpo monoclonal murino que no sea específico para hPG como un control para la unión no específica, y otro canal se debería inyectar con amortiguador de dilución solo, como una referencia para la señal de fondo. En general, en el canal inyectado con anticuerpo murino no específico no se detecta ninguna unión. Los anticuerpos que presentan un nivel elevado de asociación en este marco, que puede dar como resultado la saturación mediante hPG del anticuerpo monoclonal atrapado, se pueden ensayar frente a concentraciones más bajas de hPG (50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM y 3.125 nM), permitiendo una medida más refinada.

Las constantes de afinidad ( $K_D$ ) se calculan como la relación entre la constante de disociación ( $k_d$ ) y la constante de asociación ( $k_a$ ). Los valores experimentales se pueden validar analizando la similitud estadísticamente relevante entre las curvas experimentales en base a las medidas de unión y los perfiles teóricos.

Las constantes de afinidad de anticuerpos anti-hPG no murinos se pueden evaluar en un formato similar usando una IgG específica para la especie de origen del anticuerpo de ensayo anti-hPG.

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

Un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo de interés (anticuerpo de ensayo) compite por la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado se puede llevar a cabo como sigue. Se revisten placas de 96 pocillos con un anticuerpo anti-hPG de captura (anticuerpo policlonal o monoclonal que reconoce una región N- o C-terminal de hPG que difiere del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), a una concentración a escoger entre el intervalo de 1-10  $\mu\text{g/ml}$ , toda la noche a 4°C (0.1 a 1  $\mu\text{g/pocillo}$ ). Después de bloquear con amortiguador de bloqueo (0.1% de Tween-20, 0.1% de BSA en PBS) durante 2 h a 22°C, se añade hPG recombinante a una concentración que oscila entre 10 pM y 1 nM (10 a 1000 pg/pocillo), y se incuba durante 2 h a 22°C. Después, se añade el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado (o una mezcla que contiene el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), junto con concentraciones crecientes de anticuerpo de ensayo no marcado, y se incuba durante 1 h a 22°C. Tras lavar para eliminar anticuerpos no unidos, la detección del anticuerpo anti-hPG de referencia marcado unido se lleva a cabo incubando la mezcla con 50 ng/ml de estreptavidina-HRP durante 1 h a 22°C, seguido de la incubación con un sustrato quimioluminiscente para peroxidasa de rábano picante durante 5 minutos a 22°C, y cuantificando entonces en un luminómetro las unidades de luz relativas (RLU). Los ensayos se llevan a cabo por duplicado.

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

Se obtiene un valor de control elevado a partir de un experimento de control llevado a cabo incubando el anticuerpo

de referencia marcado con hPG recombinante sin anticuerpo de ensayo. Se obtiene un valor de control bajo a partir de un experimento de control llevado a cabo incubando el anticuerpo de referencia marcado con hPG recombinante en presencia de concentraciones en exceso del anticuerpo de referencia sin marcar (compitiendo así el anticuerpo de referencia sin marcar con el anticuerpo marcado por la unión a hPG). La capacidad de los anticuerpos de ensayo para competir con el anticuerpo anti-hPG de referencia se determina entonces incubando el anticuerpo de referencia marcado con hPG recombinante en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo de ensayo sin marcar.

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

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

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

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

#### 6.6 Ejemplo 6: Detección de PG sérica en muestras procedentes de pacientes con poliposis adenomatosa familiar

Este ejemplo muestra que niveles séricos elevados de PG se pueden correlacionar con la presencia de pólipos en personas con FAP.

##### 6.6.1 Métodos

Los niveles séricos de PG se cuantificaron como se describe en el ejemplo 1 en muestras procedentes de 6 pacientes con poliposis adenomatosa familiar. Las muestras de suero se obtuvieron de pacientes con las siguientes características:

- Dos personas (A y B), ambos mayores de 55 años, que han sufrido previamente colectomía, monitorizados regularmente mediante endoscopia, en las que no se han detectado pólipos desde la cirugía.
- Una persona (C), de 30 años, que ha sufrido previamente colectomía y cirugía de seguimiento para extirpar pólipos adicionales. La persona tuvo la cirugía varios meses antes de que se recogiese la muestra de sangre.
- Una persona (D), de 27 años, que ha sufrido previamente colectomía, que presenta múltiples pólipos en el intestino delgado (pero sin cáncer) en el momento en el que se recogió la muestra de sangre.
- Una persona (E), de 52 años, que ha sufrido previamente colectomía, que presenta múltiples pólipos en el recto en el momento en el que se recogió una muestra de sangre.
- Una persona (F), de 10 años, que presenta múltiples pólipos colorrectales en el momento en el que se recogió una muestra de sangre.

##### 6.6.2 Resultados

Los resultados mostrados en la tabla 5 a continuación se expresan como concentración media de PG ± desviación estándar (pM):

Tabla 5	
Paciente	Concentración media de PG (pM) ± s.d.
A	6.9 ± 3.3
B	0.0
C	0.0
D	167.5 ± 43.0
E	351.85 ± 96.0
F	233 ± 11.3

Los resultados indican que los niveles de PG son particularmente elevados en personas que poseen un número

elevado de pólipos en el momento de la toma de muestras. En comparación, los pacientes que han sufrido cirugía presentan niveles muy bajos o indetectables de PG.

#### 5 6.7 Ejemplo 7: Detección de PG sérica en muestras procedentes de pacientes con pólipos adenomatosos esporádicos precancerosos

Este ejemplo demuestra que más de veinticinco por ciento de personas con poliposis adenomatosa esporádica tienen mayores niveles séricos de PG.

##### 10 6.7.1 Métodos

15 Los niveles de PG se midieron en dos conjuntos diferentes de muestras: un primer conjunto de muestras obtenidas de veinticinco personas que tienen múltiples pólipos adenomatosos, similares al número que se encontraría en sujetos con FAP, y un segundo conjunto de muestras de un banco de plasma, recogido de 104 individuos de edades entre 45 y 65 años. Los niveles plasmáticos de progastrina se cuantificaron usando un ensayo ELISA, como se describe anteriormente en el ejemplo 1.

##### 20 6.7.2 Resultados

25 23% (12/52) de los sujetos con pólipos adenomatosos estudiados tuvieron niveles de progastrina por encima de 50 pM. En comparación, 16.3% (17/104) de los sujetos del grupo del banco de sangre tuvieron niveles de PG por encima de 50 pM. La historia médica de las personas cuyas muestras se tomaron del banco es desconocida. Las personas sanas tienen niveles bajos de PG, que no exceden típicamente de 50 pM. Ver, por ejemplo, Siddheshwar *et al.*, 2001, "Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma", *Gut* 48:47-52. Se piensa que los niveles por encima de 50 pM son indicativos de una patología subyacente.

30 Casi una cuarta parte de las personas en las que se encontraron pólipos asimismo tuvieron niveles de PG elevados. Esto es consistente con la observación de que alrededor de 20% de los pólipos adenomatosos esporádicos se convierten en tumores malignos, una transformación que se piensa que va acompañada de niveles de PG elevados. Por lo tanto, los niveles de PG elevados en presencia de pólipos adenomatosos pueden servir como medida útil para identificar pacientes para el seguimiento posterior, o para el tratamiento profiláctico anti-PG.

35 Con respecto a las muestras procedentes del banco de plasma, es probable que algunas o todas las muestras tomadas del banco con niveles de PG por encima de 50 pM procedieran de personas con afecciones subyacentes que provocaron niveles elevados de PG. El uso de muestras de control cribadas apropiadamente mostraría probablemente una mayor diferencia entre el porcentaje de personas con pólipos adenomatosos esporádicos y aquellas con pólipos que tienen niveles de PG por encima de 50 pM.

#### 40 6.8 Ejemplo 8: Composiciones anti-PG evitan el desarrollo de tumores en un modelo de ratón de FAP

Este ejemplo demuestra la capacidad de anticuerpos anti-hPG para prevenir la formación de tumores *in vivo*.

##### 45 6.8.1 Métodos

50 Ratones transgénicos que portan una mutación en un alelo del gen Adenomatous Polyposis Coli (APC), similar a la encontrada en personas con poliposis adenomatosa familiar (FAP), se trataron con un anticuerpo anti-hPG. Estos ratones, denominados ratones APC $\Delta$ 14, desarrollaron espontáneamente tumores en sus intestinos cuando se pierde el segundo alelo de APC (tipo salvaje) vía un mecanismo de "pérdida de heterocigocidad" (LOH), (Colnot *et al.*, 2004, "Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers", *Lab Investigation* 84:1619-1630). Los primeros tumores detectables se pueden encontrar alrededor de los dos meses de edad, y, hacia los 3.5 meses, el número de tumores es generalmente alrededor de 15-20. Se ha mostrado que estos tumores producen progastrina.

55 Ratones APC $\Delta$ 14 de cuatro meses de edad se trataron dos veces a la semana durante seis semanas con un anticuerpo policlonal de control –un antisuero anti-IgG humana de conejo (Jackson ImmunoResearch (nº de referencia 309-005-0089) – o con un anticuerpo policlonal anti-PG, provocado frente a (1) un péptido N-terminal y (2) un péptido C-terminal como se describe en Hollande *et al.*, documento WO 07/135542, mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 9 mg/kg. Los ratones se pesaron una vez a la semana. Al final del régimen de tratamiento de seis semanas, sus intestinos se fotografiaron, y se contó el número total de tumores. Hubo seis ratones en el grupo de tratamiento y en el grupo de control. El genotipaje identificó dos ratones del grupo de control que no portaron la mutación de APC heterocigota esperada, y se excluyeron del experimento.

##### 65 6.8.2 Resultados

Los resultados se muestran a continuación en la tabla 6. Los ratones tratados con anticuerpo de control exhibieron

un total de 125 tumores, con 31.25 tumores de media por ratón. Los ratones tratados con anti-PG tuvieron 46 tumores totales, o, de media, 7.6 tumores por ratón. Esta diferencia es estadísticamente significativa (prueba de Mann-Whitney, P=0.0095).

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

5 Los resultados indican que el número de tumores encontrado en cuatro de los seis animales tratados con anticuerpos anti-progastrina cae por debajo del número medio de quince a veinte tumores encontrado generalmente en ratones APC $\Delta$ 14 a los 3.5 meses de edad. Ver la tabla 6 a continuación. Estos datos indican que el tratamiento con anticuerpos anti-progastrina evita que se desarrollen nuevos tumores en estos animales.

10 **Listado de secuencias**

<110> HOUHOU, LEILA PETREMANN, MATHIEU HOLLANDE, FREDERIC JOUBERT, DOMINIQUE

15 <120> PROFILAXIS DE CÁNCER COLORRECTAL Y GASTROINTESTINAL

<130> 382657-004WO

<150> 61/317,245

20 <151> 2010-04-24

<160> 106

<170> PatentIn version 3.5

25

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1

35

Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Trp

1

5

<210> 2

<211> 8

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45

<400> 2

Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser

1

5

50

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 3

ES 2 754 774 T3

Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr  
1 5

<210> 4  
<211> 11  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

10 <400> 4

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

15 <210> 5  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 5

Lys Val Ser  
25 1

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr  
1 5

40 <210> 7  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser Trp  
50 1 5

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

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

<400> 8  
60

ES 2 754 774 T3

Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 11  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
 10 <400> 9  
 Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr  
 1 5 10  
 15 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 10  
 Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr  
 25 1 5 10  
 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
 35 <400> 11  
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr  
 1 5  
 <210> 12  
 40 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético  
 <400> 12  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 50

ES 2 754 774 T3

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

<210> 13

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 13

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

15 <210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 14

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

25

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial



ES 2 754 774 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

5 <400> 15

```

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

<210> 16

10 <211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

20

<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
ggg 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
Val Ser Ser
      115
    
```

25 <210> 17

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

ES 2 754 774 T3

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

5 <400> 17

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

10 <210> 18  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

20 <400> 18

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

25 <210> 19  
 <211> 336

ES 2 754 774 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

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

10 <400> 19

```

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

```

15 <210> 20  
<211> 80  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 20

```

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

```

25 <210> 21  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 21

ES 2 754 774 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

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

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

<400> 22

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

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

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

<400> 23

25 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

ES 2 754 774 T3

<210> 24  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético  
 <400> 24  
 10  
 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 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  
 20  
 Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly  
 1 5 10  
 <210> 26  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Ahx  
 35  
 <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  
 45  
 <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  
 50

ES 2 754 774 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 28  
5 Asp Ala Pro Leu Gly  
1 5  
  
<210> 29  
<211> 6  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 29  
  
Pro Asp Ala Pro Leu Gly  
15 1 5  
  
<210> 30  
<211> 7  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
  
<400> 30  
  
Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp  
25 1 5  
<210> 31  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
30 <400> 31  
  
Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp  
1 5  
  
35 <210> 32  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
40 <400> 32  
  
Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly  
1 5 10  
  
<210> 33  
<211> 4  
<212> PRT  
45 <213> Homo sapiens  
  
<400> 33  
  
50 Phe Gly Arg Arg  
1  
  
<210> 34  
<211> 5  
<212> PRT  
55 <213> Homo sapiens  
  
<400> 34  
  
60 Met Asp Phe Gly Arg  
1 5

<210> 35  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 35  
 Ala Glu Asp Glu Asn  
 1 5  
 10 <210> 36  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 36  
 Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg  
 1 5  
 20 <210> 37  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 37  
 Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala  
 1 5  
 30 <210> 38  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
 <400> 38  
 40 Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr Gly  
 1 5  
 <210> 39  
 <211> 8  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
 50 <400> 39  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr  
 1 5  
 55 <210> 40  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

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

5 <210> 41  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

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

15 <210> 42  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

25 <400> 42  
 Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr  
 1 5

30 <210> 43  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

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

40 <210> 44  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

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

50 <210> 45  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

60 <400> 45



# ES 2 754 774 T3

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

5 <210> 46  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 46

Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr  
1 5

15 <210> 47  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 47

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

30 <210> 48  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 48

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

40 <210> 49  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 49

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

50 <210> 50  
<211> 11  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

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

60 <400> 50

ES 2 754 774 T3

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

<210> 51  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

10 <400> 51

Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr  
 1 5

15 <210> 52  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 52

Gln Met Ser  
 1

25 <210> 53  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 53

Leu Val Ser  
 1

40 <210> 54  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 54

Val Lys Lys Asp Gly Ser His  
 1 5

50 <210> 55  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 55

60 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 56  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
  
 10 <400> 56  
  
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr  
 1 5  
  
 <210> 57  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
  
 <400> 57  
  
 Trp Gln Gly Thr His Ser Pro Tyr Thr  
 1 5  
  
 25 <210> 58  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético  
  
 <400> 58  
  
 35 Gly Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val  
 1 5 10  
  
 <210> 59  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético  
  
 45 <400> 59  
  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr  
 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

50

ES 2 754 774 T3

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

5

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

<400> 60

10

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10
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  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

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

<400> 61

20

```
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 Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100          105          110
Leu Thr Val Ser Ser
115
```

<210> 62  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

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

<400> 62

30

ES 2 754 774 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>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 63

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

15 <210> 64

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 64

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

25

<210> 65

ES 2 754 774 T3

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

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

<400> 65

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

<210> 66  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 66

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

25 <210> 67  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

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

35 <400> 67

ES 2 754 774 T3

```

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 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
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
Leu Thr Val Ser Ser
          115

```

5 <210> 68  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

15 <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
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
          342

```

20 <210> 69  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

# ES 2 754 774 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(351)

<400> 69

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

10

<210> 70

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

20

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 70



ES 2 754 774 T3

```

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

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

15 <400> 71

```

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

```

<210> 72

20 <211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

ES 2 754 774 T3

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

5 <400> 72

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

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

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

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

20 <400> 73

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

25 <210> 74  
 <211> 345  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 754 774 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 74

```

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

```

<210> 75

<211> 117

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 75

```

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

```

25 <210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

ES 2 754 774 T3

<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

5 <210> 77  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 77

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

20 <210> 78  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 78

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

ES 2 754 774 T3

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

5

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

<400> 79

10

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

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

15

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

<400> 80

20

```
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
```

25

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

30

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

<400> 81

ES 2 754 774 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>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<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>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 83

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

25

<210> 84

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<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
```

10 <210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 85

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

<210> 86

<211> 117

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

30

<400> 86

ES 2 754 774 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 Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 87

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10

<400> 87

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

15 <210> 88

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 88

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



ES 2 754 774 T3

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

5

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

<400> 89

10

```

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

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

15

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

20

<400> 90

```

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

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

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

30

<400> 91

ES 2 754 774 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

<210> 92

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 92

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

15 <210> 93

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 93

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

25

ES 2 754 774 T3

115

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

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

<400> 94

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

15 <210> 95  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 95

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

25 <210> 96  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(3)

ES 2 754 774 T3

<223> Ahx

<400> 96

Cys Xaa Xaa Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly  
 1 5 10 15  
 5 Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn  
 20 25

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

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

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(3)  
 <223> Ahx

20 <400> 97

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

25 <210> 98  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (11)..(12)  
 <223> Ahx

<400> 98

Phe Gly Arg Arg Ser Ala Glu Asp Glu Asn Xaa Xaa Cys  
 40 1 5 10

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

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

50 <400> 99

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

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

<400> 100

60

ES 2 754 774 T3

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

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

<400> 101

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

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

<400> 102

20 Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val Ala Asp Pro Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met  
 20 25 30  
 Asp Phe

25 <210> 103  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens

<400> 103

30 Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His Leu Val Ala Asp Pro Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met  
 20 25 30  
 Asp Phe Gly  
 35

<210> 104  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 35 <213> Homo sapiens

<400> 104

# ES 2 754 774 T3

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

<210> 105  
<211> 18  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 105

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

<210> 106  
<211> 6  
<212> PRT  
15 <213> Homo sapiens

<400> 106

Ser Ala Glu Asp Glu Asn  
1 5  
20

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal antiprogastrina humana (hPG) neutralizante para la utilización en la prevención del cáncer gastrointestinal en un sujeto humano, que comprende administrar a un sujeto humano predispuesto a desarrollar pólipos adenomatosos una cantidad del anticuerpo monoclonal anti-hPG suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico,

en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende:

- a. una región variable de cadena pesada en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 1.3 (SEC ID n°: 1), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 2.3 (SEC ID n°: 2) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 3.3 (SEC ID n°: 3) y una región variable de cadena ligera en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 1.3 (SEC ID n°: 4), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 2.3 (SEC ID n°: 5) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 3.3 (SEC ID n°: 6); o
- b. una región variable de cadena pesada en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 1.4 (SEC ID n°: 7), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 2.4 (SEC ID n°: 8) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 3.4 (SEC ID n°: 9) y una región variable de cadena ligera en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 1.4 (SEC ID n°: 10), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 2.4 (SEC ID n°: 5), y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 3.4 (SEC ID n°: 11); o
- c. una región variable de cadena pesada en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 1.16 (SEC ID n°: 39), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 2.16 (SEC ID n°: 43) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 3.16 (SEC ID n°: 47) y una región variable de cadena ligera en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 1.16 (SEC ID n°: 50), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 2.16 (SEC ID n°: 53) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 3.16 (SEC ID n°: 57); o
- d. una región variable de cadena pesada en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 1.19 (SEC ID n°: 40), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 2.19 (SEC ID n°: 44) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 3.19 (SEC ID n°: 48) y una región variable de cadena ligera en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 1.19 (SEC ID n°: 51), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 2.19 (SEC ID n°: 54) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 3.19 (SEC ID n°: 58), o
- e. una región variable de cadena pesada en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 1.8 (SEC ID n°: 37), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 2.8 (SEC ID n°: 41) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 3.8 (SEC ID n°: 45) y una región variable de cadena ligera en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 1.8 (SEC ID n°: 49), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 2.8 (SEC ID n°: 52) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 3.8 (SEC ID n°: 55); o
- f. una región variable de cadena pesada en la que CDR 1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 1.13 (SEC ID n°: 38), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 2.13 (SEC ID n°: 42) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> CDR 3.13 (SEC ID n°: 46) y una región variable de cadena ligera en la que CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 1.13 (SEC ID n°: 50), CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 2.13 (SEC ID n°: 53) y CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> CDR 3.13 (SEC ID n°: 56); o

dicho anticuerpo monoclonal se obtiene del hibridoma seleccionado de entre el grupo que consiste en 1B4A11D11 como se registra bajo CNCM n° I-4371, 1B6A11F2 como se registra bajo CNCM n° I-4372, 1B11E4611 como se registra bajo CNCM n° I-4373, 2B4C8C8 como se registra bajo CNCM n° I-4374, 2B11E6G4 como se registra bajo CNCM n° I-4375 y 1E9A4A4 como se registra bajo CNCM n° I-4376.

2. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo antiprogastrina humana se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.

3. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo presenta una afinidad de unión a progastrina comprendida entre  $10^{-6}$  M y  $10^{-12}$  M, medida según el ejemplo 4.

4. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que

dicho anticuerpo comprende:

- 5
- a. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 12 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 13; o
  - b. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 14 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 15; o
  - 10 c. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 59 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 63; o
  - d. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 60 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 64; o
  - 15 e. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 61 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 65; o
  - 20 f. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 62 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 66.
5. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo monoclonal anti-hPG humanizado.
- 25 6. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo comprende:
- a. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 21 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 22; o
  - 30 b. una región variable de cadena pesada de secuencia SEC ID nº: 23 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEC ID nº: 24; o
  - 35 c. una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 75, SEC ID nº: 77 y SEC ID nº: 79 y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 76 y SEC ID nº: 78; o
  - d. una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 80 y SEC ID nº: 82 y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 81 y SEC ID nº: 83; o
  - 40 e. una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 84, SEC ID nº: 86 y SEC ID nº: 88 y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 85, SEC ID nº: 87 y SEC ID nº: 89; o
  - 45 f. una región variable de cadena pesada de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 90, SEC ID nº: 92 y SEC ID nº: 94 y una región variable de cadena ligera de secuencia seleccionada entre SEC ID nº: 91, SEC ID nº: 93 y SEC ID nº: 95.
- 50 7. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto presenta una mutación en el gen APC asociado con la poliposis adenomatosa.
8. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según la reivindicación 7, en el que el sujeto presenta poliposis adenomatosa familiar.
- 55 9. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según la reivindicación 7, en el que el sujeto presenta poliposis adenomatosa esporádica.
- 60 10. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG se administra complementario a una resección quirúrgica de tejido que comprende pólipos adenomatosos.
- 65 11. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG se administra complementario a quimioterapia.
12. Anticuerpo monoclonal anti-hPG para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG se administra complementario al tratamiento con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.



FIG. 1

Preprogastrina: M QRLCVYVLIF ALALAAFSEA SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG  
 -21 -11 -1 +1 11 21  
 PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEEAYGWMD FGRRSAEDEN  
 31 41 51 61 71

Progastrina SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG  
 +1 11 21

G34: PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEEAYGWMD FGRRSAEDEN  
 31 41 51 61 71

G34-Gly: QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEEAYGWMD F-NH<sub>2</sub>  
 41 51 61 71

G17: QLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEEAYGWMD FG  
 41 51 61 71

G17-Gly: QGPWLE EEEEEAYGWMD F-NH<sub>2</sub>  
 61 71

CTFP: QGPWLE EEEEEAYGWMD FG  
 61 71

SAEDEN  
 75

FIG. 2A

mV<sub>H</sub> MAb3

gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac	96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser <b>Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr</b>	
20 25 30	
tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att	144
<b>Trp</b> 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 <b>Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser</b> 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
<b>Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr</b> Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr	
100 105 110	
gtc tcc tca	345
Val Ser Ser	
115	

FIG. 2B

mV<sub>L</sub> MAb3

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

FIG. 2C

mV<sub>H</sub> MAb4

cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr <b>Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser</b>	
20 25 30	
tgg ata gag tgg tta aaa cag agg cct gga cat ggc ctt gag tgg att	144
<b>Trp</b> 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 <b>Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr</b> 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
<b>Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr</b> Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
ctg gtc act gtc tct gca	354
Leu Val Thr Val Ser Ala	
115	

FIG. 2D

mV<sub>L</sub> MAb4

gat ctt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga	48
Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt	96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser <b>Gln Ser Leu Val His Ser</b>	
20 25 30	
agt gga gtc acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct	144
<b>Ser Gly Val Thr Tyr</b> 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 <b>Lys Val Ser</b> 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 <b>Ser Gln Ser</b>	
85 90 95	
aca cat gtt cct ccc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa	336
<b>Thr His Val Pro Pro Thr</b> Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105 110	

FIG. 2E

mV<sub>H</sub> MAb8

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

FIG. 2F

mV<sub>L</sub> MAb8

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly	
1 5 10 15	
aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act	96
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser <u>Lys Ser Leu Arg His Thr</u>	
20 25 30	
aaa ggc atc act ttt ttg tat tgg tat ctg cag aag cca ggc cag tct	144
<u>Lys Gly Ile Thr Phe</u> 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 <u>Gln Met Ser</u> 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 <u>Ala Gln Asn</u>	
85 90 95	
cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa	336
<u>Leu Glu Leu Pro Leu Thr</u> Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
100 105 110	

FIG. 2G

mV<sub>H</sub> MAb13

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gtg	cag	cct	gga	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aaa	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	att	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	<b>Gly</b>	<b>Phe</b>	<b>Ile</b>	<b>Phe</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	
			20					25						30		
ggc	atg	tct	tgg	gtt	cgc	cag	tct	cca	gac	agg	agg	ctg	gag	ttg	gtc	144
<b>Gly</b>	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	<b>Ile</b>	<b>Asn</b>	<b>Thr</b>	<b>Phe</b>	<b>Gly</b>	<b>Asp</b>	<b>Arg</b>	<b>Thr</b>	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
<b>Ala</b>	<b>Arg</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Gly</b>	<b>Thr</b>	<b>Tyr</b>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	
			100					105						110		
tcc	tca															342
Ser	Ser															



FIG. 2H

mV<sub>L</sub> MAb13

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

FIG. 2I

mV<sub>H</sub> MAb16

cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser <b>Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr</b>	
20 25 30	
tat atg tac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att	144
<b>Tyr</b> 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 <b>Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr</b> 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
<b>Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr</b> Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
100 105 110	
ctc aca gtc tcc tca	351
Leu Thr Val Ser Ser	
115	

FIG. 2J

mV<sub>L</sub> MAb16

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

FIG. 2K

mV<sub>H</sub> MAb19

gat	gtg	cag	ctt	cag	gag	tcg	gga	cct	ggc	ctg	gtg	aaa	cct	tct	cag	48
Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln	
1				5					10					15		
tct	ctg	tcc	ctc	aca	tgc	act	gtc	act	ggc	tac	tca	atc	acc	agt	gat	96
Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	<b>Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp</b>							
			20					25					30			
tat	gcc	tgg	aat	tgg	atc	cgg	cag	ttt	cca	gga	aac	aaa	ctg	gag	tgg	144
<b>Tyr Ala</b>	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	<b>Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr</b>							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
<b>Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr</b>														Trp	Gly	
			100					105					110			
caa	ggc	acc	att	gtc	aca	gtc	tcc	tca								363
Gln	Gly	Thr	Ile	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120									

FIG. 2L

mV<sub>L</sub> MAb19

caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc	48
Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc	96
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser <u>Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr</u>	
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 <u>Val Lys Lys Asp Gly Ser His</u> 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 <u>Gly Val Gly Asp</u>	
85 90 95	
gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc	336
<u>Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val</u> Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val	
100 105 110	
act gtc cta	345
Thr Val Leu	
115	

FIG. 3A

hV<sub>H</sub> MAb3

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser  
 115

FIG. 3B

hV<sub>L</sub> MAb3

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

FIG. 3C

hV<sub>H</sub> MAb4

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115



FIG. 3D

hV<sub>L</sub> MAb4

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3E

hV<sub>H</sub> MAb8(a)

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

FIG. 3F

hV<sub>L</sub> MAb8(a)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3G

hV<sub>H</sub> MAb8(b)

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

FIG. 3H

hV<sub>L</sub> MAb8(b)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3I

hV<sub>H</sub> MAb8(c)

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

FIG. 3J

hV<sub>L</sub> MAb8(c)

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

FIG. 3K

hV<sub>H</sub> MAb13(a)

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



FIG. 3L

hV<sub>L</sub> MAb13(a)

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

FIG. 3M

hV<sub>H</sub> MAb13(b)

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

FIG. 3N

hV<sub>L</sub> MAb13(b)

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

FIG. 30

hV<sub>H</sub> MAb16(a)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
 115

FIG. 3P

hV<sub>L</sub> MAb16(a)

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

FIG. 3Q

hV<sub>H</sub> MAb16(b)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
 115

FIG. 3R

hV<sub>L</sub> MAb16(b)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3S

hV<sub>H</sub> MAb16(c)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser  
 115



FIG. 3T

hV<sub>L</sub> MAb16(c)

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

FIG. 3U

hV<sub>H</sub> MAb19(a)

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

FIG. 3V

hV<sub>L</sub> MAb19(a)

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys  
 115

FIG. 3W

hV<sub>H</sub> MAb19(b)

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

FIG. 3X

hV<sub>L</sub> MAb19(b)

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys  
 115

FIG. 3Y

hV<sub>H</sub> MAb19(c)

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

FIG. 3Z

hV<sub>L</sub> MAb19(c)

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys  
 115