Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** BIOREALITES; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DOMICILIO PARIS – FRANCIA

74. **APODERADO** MARIA VICTORIA LIEBBE LOZANO

22. **BOGOTÁ, D.C.,** ABRIL DE 2012

(FORMA P-10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

FORMULARIO ÙNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE:

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[X] Capítulo I [ ] Capítulo II

(2) SOLICITANTE

Nombre: BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Dirección: 35 RUE DE VERDUN 92284 Suresnes Cedex
Nacionalidad o Domicilio: PARIS - FRANCIA
Lugar de Constitución: FRANCIA
Teléfono: 01.55.72.60.00 Fax:
E- mail:

IDENTIFICACION
[ ] C.C. [ ] NIT
[ ] C.E. [ ] Otro
Cúal
Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: MARIA VICTORIA LIEBBE LOZANO
Dirección: CALLE 122 # 48-11 Bogotá
Teléfono: 742 01 91 Fax: 742 01 93
E- mail:

IDENTIFICACIÓN
[X] C.C. [ ] NIT
[ ] C.E. [ ] Otro
Cúal
Número 51.819.220 TP 54.845

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el numero de radicación (del poder).

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER ANEXO NO. 4
Dirección: VER ANEXO NO. 4
Nacionalidad o Domicilio:

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/006329 Fecha 15-10-2010
Publicación internacional No. WO 2011/045080A2 Fecha 21-04-2011

(6) Título (54) ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS.

(7) Clasificación internacional (51)

(8) Prioridad

[X] SI [ ] NO

(33)País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
ESTADOS UNIDOS	16-10-2009	61/252,625

(9) Comprobante de pago No. 12 - 0033772 **Fecha** 09-04-2012

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

10 Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- [ ] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [X] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros

11 FIGURA CARACTERISTICA:

12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE MARIA VICTORIA LIEBBE

FIRMA

C.C. 51.819.220 **TP** 54.845

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

2

ANEXO No. 1

TRADUCCION SIMPLE DE LA PRIMERA SOLICITUD – DESCRIPCION DE LA INVENCION

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional no. 61/252.625, presentada el 16 de octubre, 2009, el contenido de todas las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN RESPECTO A INVESTIGACIÓN FINANCIADA FEDERALMENTE

[0002] Ninguna.

PARTES DE UN ACUERDO DE INVESTIGACIÓN CONJUNTO

[0003] Ninguna.

REFERENCIA A LISTADO DE SECUENCIAS, TABLA O PROGRAMA INFORMÁTICO

[0004] Un Listado de Secuencias se incluye adjunto.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0005] La presente descripción está dirigida, entre otras cosas, a anticuerpos monoclonales frente a progastrina, a composiciones y métodos para preparara dichos anticuerpos y a métodos para usar dichos anticuerpos, por ejemplo en el diagnóstico y/o tratamiento de cáncer colorrectal.

ANTECEDENTES

[0006] El Cáncer Colorrectal (CRC) es un problema de salud pública importante, que afecta a más de 1.000.000 de personas cada año y que es responsable de más de 500.000 muertes cada año. CRC es la segunda causa principal de muerte debida al cáncer. En los Estados Unidos sólo, para 2009, se indicaron aproximadamente 147.000 nuevos casos y más de 49.900 muertes debidas a CRC. Existen tres formas de CRC: CRC esporádico; cáncer de colon hereditario no poliposo (HNPCC), causado por mutaciones en la línea germinal en genes de reparación de emparejamientos erróneos de ADN y poliposis adenomatosa familiar (FAP), debida a mutaciones en la línea germinal en el gen APC. El CRC esporádico representa cerca del 85% de los casos, mientras que HNPCC representa aproximadamente el 5% y FAP representa aproximadamente el 1% (Heyer *et al.*, 1999, Oncogene 18:5325-5333).

4

[0007] La gestión clínica de CRC implica típicamente la resección quirúrgica de tumores acompañada frecuentemente de quimioterapia. Actualmente, aproximadamente el 50% de los pacientes con CRC mueren en los cinco años después del diagnóstico. La ausencia de ensayos de cribado fiables y la ineficacia de las terapias disponibles actualmente son las causas principales de la alta proporción de mortalidad. Existe una necesidad urgente de nuevas estrategias clínicas para diagnosticar CRC, así como de tratamientos eficaces frente a los tumores de cáncer colorrectal que tengan efectos adversos mínimos en, por lo demás, el tejido sano.

RESUMEN

[0008] La presente solicitud proporciona composiciones y métodos útiles para diagnosticar y/o tratar el cáncer colorrectal (CRC) en animales, incluyendo seres humanos. Las diferentes invenciones descritas en la solicitud se basan, en parte, en el descubrimiento de los solicitantes de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la progastrina (PG), por ejemplo, progastrina humana (hPG), un polipéptido producido por las células de tumor de CRC y que presenta propiedades antiproliferativas en modelos de CRC *in vitro*.

[0009] La progastrina es producida por las células de tumor colorrectal y se piensa que estimula la proliferación de estas células desencadenando una ruta de transducción de la señal que bloquea los procesos de diferenciación normales de las células, incluyendo aquellos procesos que dan lugar a la muerte celular. La depleción del transcrito del gen de la gastrina que codifica la progastrina induce la diferenciación celular y la muerte celular programada en células tumorales en modelos de CRC *in vitro* e *in vivo*, reduciendo la proliferación de las células tumorales. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de operación, a través de la unión de PG, se piensa que los anticuerpos anti-hPG bloquean o inhiben su capacidad de interaccionar con su o sus parejas de señalización. Esto, a su vez, inhibe una ruta de transducción de la señal en células de tumor colorrectal que de otra manera daría lugar a la proliferación.

[0010] De acuerdo con esto, en un aspecto, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PG, por ejemplo hPG, pero no a otros productos del gen de la gastrina. Respecto a la FIG. 1, el gen de la gastrina se

traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos, denominado pre-progastrina, que contiene una secuencia señal (subrayada) que se escinde, dando lugar a la progastrina, un polipéptido de 80 aminoácidos. La progastrina, a su vez, se escinde para generar un producto de 34 aminoácidos, correspondiente a los residuos 38 a 71 de la progastrina, que se extiende en su extremo carboxi con un residuo de glicina, generando G34 extendido con glicina ("G34-Gly"). Un subproducto de esta escisión es un péptido de 5 aminoácidos, denominado el péptido flanqueante C-terminal, o CTFP, que incluye los residuos 75 a 80 de la progastrina. G34-Gly se escinde adicionalmente para generar un polipéptido de 17 residuos correspondiente en secuencia a los residuos 55 a 71 de la progastrina y referido como G17-Gly. La eliminación de las glicinas C-terminales de G34-Gly y G17-Gly, seguido de la amidación C-terminal, da lugar a G34 y G17, respectivamente, estando los dos amidados en el extremo C-terminal. Así, mientras los primeros 37 residuos de la progastrina son únicos a ella (es decir, no están presentes en sus productos de procesamiento, tales como G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, o CFTP), los residuos 38 a 80 también están presentes en los productos posteriores a la traducción del gen de la gastrina.

[0011] Los solicitantes han descubierto que, aunque pueden generarse anticuerpos monoclonales anti-PG usando métodos conocidos para los expertos en la técnica, la selección del antígeno es importante. No todos los antígenos derivados de hPG estimulan la producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG bajo condiciones fisiológicas. Como se describe más adelante, varios antígenos usados para generar anticuerpos policlonales frente a hPG, tales como progastrina humana recombinante de longitud completa (*véase, por ejemplo.*, Singh WO 08/076454) y péptidos correspondientes a los últimos diez aminoácidos en el extremo C-terminal de hPG (*véase, por ejemplo*, Hollande WO 07/135542), fracasaron para generar anticuerpos monoclonales anti-hPG. Los solicitantes, sin embargo, han descubierto secuencias N- y C-terminales antigénicas en la secuencia de hPG que pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG. Bastante sorprendentemente, los solicitantes han descubierto que no es necesario limitar las secuencias del antígeno a cadenas de la secuencia de PG que son únicas a ella para obtener anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PG y no a otros

productos derivados del gen de la gastrina. Los antígenos peptídicos que tienen secuencias en común con otros productos del gen de la gastrina, por ejemplo G17, G34, y CTFP, rindieron anticuerpos monoclonales que no sólo se unen a hPG, sino que se unen a ella específicamente.

[0012] Los solicitantes han generado anticuerpos monoclonales usando antígenos derivados de diferentes regiones de la molécula de hPG. Los anticuerpos monoclonales anti-PG que se pueden obtener usando un antígeno peptídico que tiene una secuencia correspondiente a una región N-terminal de hPG, y/o que se unen a una región N-terminal de hPG, se refieren en la presente memoria como "anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales." Una región antigénica ejemplar específica que puede usarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales corresponde a los residuos 1 a 14 de hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO:25). Los inmunógenos ejemplares incluyendo este antígeno útiles para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales se describen en la Tabla 1A y en la sección de los Ejemplos.

[0013] Los anticuerpos monoclonales anti-PG que se pueden obtener usando un antígeno peptídico que tiene una secuencia correspondiente a una región C-terminal de hPG, y/o que se unen a una región C-terminal de hPG, se refieren en la presente memoria como "anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales." Una región antigénica ejemplar específica que puede usarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG C-terminales corresponde a los residuos 55 a 80 de hPG: QGPWLEEEEEAYGWMDFG RRSAEDEN (SEQ ID NO:27). Los inmunógenos ejemplares incluyendo este antígeno útiles para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG C-terminales se describen en la Tabla 1B y en la sección de los Ejemplos.

[0014] Para algunos usos, es deseable tener anticuerpos monoclonales anti-hPG con alta afinidad para hPG. Para determinados usos, tales como usos terapéuticos, es deseable una afinidad de al menos aproximadamente 100 nM, aunque los anticuerpos que tienen afinidades mayores, por ejemplo afinidades de al menos aproximadamente 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, o incluso mayores, pueden ser

deseables. Los distintos anticuerpos monoclonales anti-PG ejemplares específicos descritos en la presente memoria presentan afinidades que van de 10^{-6} a 10^{-12} M (véase la Tabla 6). Un anticuerpo monoclonal anti-PG que tiene una afinidad especialmente adecuada para una aplicación particular deseada puede seleccionarse fácilmente de entre éstos, o generarse o diseñarse usando los diferentes inmunógenos, secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR), secuencias variables de la cadena pesada V_H y variables de la cadena ligera V_L y métodos descritos en la presente memoria. La afinidad de cualquier anticuerpo monoclonal anti-PG particular puede determinarse usando técnicas muy conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria, tales como por ejemplo, ELISA, calorimetría isotérmica de titulación (ITC), BIAcore, o ensayo de polarización fluorescente.

[0015] hPG es un polipéptido relativamente pequeño, teniendo una longitud de sólo 80 aminoácidos. Se esperaría que cualquier anticuerpo monoclonal que se una específicamente a hPG con una afinidad relativamente alta (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 nM) interfiera con la capacidad de PG de interaccionar con su o sus parejas de señalización y, como resultado, inhiba la proliferación de las células de CRC. Sin embargo, los Solicitantes han descubierto que no todos los anticuerpos monoclonales anti-PG son neutralizantes (es decir, no todos los anticuerpos monoclonales que se unen a PG interfieren con o inhiben su actividad de señalización biológica). De hecho, como se discutirá con más detalle en la sección de los Ejemplos, los Solicitantes han descubierto que algunos de los anticuerpos monoclonales anti-PG, a pesar de presentar una especificidad alta y una afinidad alta para PG, no neutralizan PG. Por ejemplo, el MAb14 anti-hPG se une a hPG con una K_D de aproximadamente 6 pM pero no inhibe el crecimiento de las células de CRC *in vitro* como se detalla en la sección de los Ejemplos más adelante. Aunque los anticuerpos monoclonales no neutralizantes que se unen específicamente a hPG son útiles para propósitos de diagnóstico, aquellos anticuerpos monoclonales anti-hPG que neutralizan PG son particularmente adecuados para las aplicaciones terapéuticas para tratar CRC.

[0016] Tal y como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante" es un anticuerpo monoclonal anti-hPG que da lugar a una reducción estadísticamente significativa del número de células de CRC vivas en una muestra de

6

ensayo tratada con el anticuerpo monoclonal anti-hPG comparado con una muestra control tratada con un anticuerpo monoclonal no específico. Un ensayo específico para evaluar la capacidad de cualquier anticuerpo monoclonal anti-hPG particular para neutralizar hPG se describe en la sección de la Descripción Detallada más adelante. Se cree que aquellos anticuerpos monoclonales anti-hPG que presentan al menos aproximadamente un 50% de reducción del número de células vivas en este ensayo son especialmente útiles para tratar CRC, aunque se espera que los anticuerpos monoclonales anti-hPG que presentan niveles menores de actividad neutralizante, por ejemplo, una reducción estadísticamente significativa del 40%, 30%, 20%, 15%, o incluso 10% del número de células vivas en este ensayo proporcionen beneficios terapéuticos.

[0017] De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-PG son anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes. Se ha descubierto que la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG para neutralizar PG no es dependiente de epítopo. Como se ejemplifica en la sección de los Ejemplos, tanto los anticuerpos anti-PG N-terminales como C-terminales tienen actividad neutralizante. Así, en algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes son anticuerpos neutralizantes N-terminales, en otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-PG son anticuerpos neutralizantes C-terminales.

[0018] El mapeo de epítopos revela que los anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales no se unen todos al mismo epítopo, incluso cuando se generan frente al mismo inmunógeno. Lo mismo es cierto para los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales. Los epítopos unidos por los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales y C-terminales ejemplares, según se identifica mediante escaneo de alanina y técnica SPOT, se proporcionan en la sección de los Ejemplos, en las Tablas 8 y 9.

[0019] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen a un epítopo que incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte N-terminal de hPG. En realizaciones específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales se unen a un epítopo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEQ ID NO:28), residuos 9 a 14 de hPG (SEQ ID NO:29), residuos 4 a 10 de hPG (SEQ ID

NO:30), residuos 2 a 10 de hPG (SEQ ID NO:31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEQ ID NO:32).

[0020] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen a un epítopo que incluye una secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte de una región C-terminal de hPG. En realizaciones específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales se unen a un epítopo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEQ ID NO:33), residuos 69 a 73 de hPG (SEQ ID NO:34), residuos 76 a 80 de hPG (SEQ ID NO:35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEQ ID NO:36).

[0021] Se espera que las CDR y/o cadenas V_H y V_L correspondientes de los anticuerpos monoclonales anti-hPG que se unen aproximadamente a los mismos epítopos puedan intercambiarse para dar lugar a nuevos anticuerpos monoclonales anti-hPG. Por ejemplo, como se indica en la Tabla 9, los anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplares MAb 5 y MAb 6 se unen al mismo epítopo. Puede diseñarse un anticuerpo monoclonal anti-hPG que incluya, en su cadena V_L, varias combinaciones de las CDR de V_L de estos dos anticuerpos, y/o en su cadena V_H varias combinaciones de las CDR de V_H de estos dos anticuerpos. Como un ejemplo específico, para ilustrar las varias combinaciones posibles, dicho anticuerpo podría incluir en su cadena V_L, las CDR 1 y 2 de MAb 5 (V_L CDR1.5 y V_L CDR2.5, respectivamente) y CDR 3 de MAb 6 (V_L CDR3.6), y en su cadena V_H, la CDR 1 de MAb 6 (V_H CDR1.6) y las CDRs 2 y 3 de MAb 5 (V_H CDR2.5 y V_H CDR3.5, respectivamente).

[0022] Se han identificado varios anticuerpos monoclonales anti-hPG que tienen una alta especificidad y afinidad para hPG y que presentan una buena actividad anti-tumoral en ensayos *in vitro*, y en algunos casos se han determinado las secuencias de sus CDR, secuencias de sus cadenas V_H y V_L, y/o secuencias de cadenas V_H y V_L propuestas para las versiones humanizadas. También se han depositado varios hibridomas. Todos estos anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplares, así como otras realizaciones específicas de anticuerpos monoclonales anti-hPG útiles en los diferentes kits y métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo anticuerpos monoclonales que compiten para la unión a PG con un anticuerpo de referencia, se describen con más detalle en la sección de la Descripción Detallada.

[0023] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción incluyen anticuerpos que compiten con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia para la unión a hPG. El anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia puede ser cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria. Los ejemplos no limitativos incluyen: anticuerpos que comprenden tres CDR de V_L y tres CDR de V_H como se describe en la presente memoria; anticuerpos que comprenden una cadena V_H y una cadena V_L que tienen secuencias de aminoácidos como se muestra en la presente memoria; anticuerpos que comprenden polipéptidos de cadena pesada y ligera humanizados como se muestra en la presente memoria; anticuerpos producidos por uno cualquiera de los hibridomas descritos en la presente memoria; anticuerpos que se unen a un epítopo en hPG como se describe en la presente memoria.

[0024] Los anticuerpos monoclonales anti-PG descritos en la presente memoria pueden estar en la forma de anticuerpos de longitud completa, anticuerpos de múltiples cadenas o de cadena única, fragmentos de dichos anticuerpos que se unen selectivamente a PG (incluyendo pero no limitado a Fab, Fab', $(Fab')_2$, Fv, y scFv), surrobodies (incluyendo construcción de cadena ligera sucedánea), anticuerpos de un único dominio, anticuerpos humanizados, anticuerpos camelizados y semejantes. También pueden ser de, o derivados de, cualquier isotipo incluyendo, por ejemplo, IgA (*por ejemplo*, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (*por ejemplo,* IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), o IgM. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PG es una IgG (*por ejemplo,*. IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

[0025] Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden tener un origen humano o no humano. Los ejemplos de anticuerpos anti-PG con un origen no humano incluyen pero no están limitados a, aquellos con origen de mamíferos (*por ejemplo,* simios, roedores, cabras y conejos). Los anticuerpos monoclonales anti-PG para uso terapéutico en seres humanos son preferiblemente humanizados.

[0026] En otro aspecto, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos capaces de ser usados para producir anticuerpos monoclonales anti-PG. Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada de inmunoglobulinas para los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria, y los vectores que comprenden los ácidos nucleicos. Además, en la presente

memoria se proporcionan células huésped procariotas y eucariotas transformadas con dichos vectores, así como células huésped eucariotas, *por ejemplo.*, de mamíferos, modificadas por ingeniería para expresar los polipéptidos de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales anti-hPG. También se proporcionan células huésped capaces de expresar tanto la cadena ligera como pesada y secretar los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria en el medio en el que se cultivan las células huésped. En algunas realizaciones, la célula huésped es un hibridoma. También se proporcionan métodos para producir anticuerpos monoclonales anti-hPG cultivando las células huésped.

[0027] Los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes, tales como anticuerpos monoclonales anti-hPG, se unen a PG y bloquean la señalización dependiente de PG, lo que resulta en la inhibición de las respuestas inducidas por PG en las células de tumor de CRC. De acuerdo con esto, también se proporcionan métodos para inhibir las respuestas inducidas por PG de células de CRC, lo que incluye la represión de la diferenciación celular, represión de la muerte celular y/o estimulación de la proliferación celular. Generalmente, el método comprende poner en contacto una célula de CRC con, o exponer una población de células a, un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante en una cantidad eficaz para inhibir una o más de las respuestas inducidas por PG en células de CRC. El método puede realizarse *in vitro* o *in vivo*, por la administración de un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante al entorno que contiene células de CRC, que podría ser un cultivo celular o en un tumor.

[0028] Los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes descritos en la presente memoria inhiben la proliferación dependiente de PG de las células de tumor de CRC, lo que les hace agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de cáncer colorrectal. De acuerdo con esto, también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante y métodos para usar los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes y/o composiciones farmacéuticas para tratar CRC. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier ruta conveniente de administración, incluyendo por ejemplo inyección parenteral, subcutánea o intravenosa e incluirá típicamente un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y uno o más vehículos, excipientes y/o diluyentes aceptables, adecuados para el modo deseado de

administración y pueden incluir otros componentes opcionales como se describirá más en la sección de la Descripción Detallada. Para usos terapéuticos, las composiciones pueden envasarse en forma de dosificación unitaria para facilitar su uso.

[0029] Los métodos de tratamiento comprenden generalmente administrar a un sujeto que necesita tratamiento, por ejemplo un sujeto diagnosticado de CRC, una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante y/o composición farmacéutica de éste eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. El beneficio terapéutico, descrito más adelante con más detalle, incluye cualquier mejora de CRC, por ejemplo, ralentizar o parar la progresión de CRC, reducir la gravedad de CRC, inhibir el crecimiento de tumores de CRC o la proliferación de células de CRC, reducir el tamaño de los tumores de CRC y/o reducir los niveles séricos de PG en pacientes con CRC. El sujeto puede ser un ser humano o no humano, incluyendo un animal domesticado (por ejemplo, gato, perro, vaca, cerdo, caballo) o un animal no domesticado. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal anti-PG es específico para la PG de la especie que se trata. Por ejemplo, un anticuerpo anti-hPG se administra a un paciente humano, un anticuerpo anti-PG de perro se administra a un paciente canino, y semejantes. Los sujetos en los que la terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG es útil pueden: ser pacientes en cualquier estadio de la progresión de la enfermedad (*por ejemplo,* CRC Estadio 0, I, II, III, o IV), pacientes que han recibido terapia para CRC (por ejemplo, quimioterapia, terapia de radiación, resección quirúrgica) o pacientes que están recibiendo otra terapia para CRC.

[0030] El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-PG como se describe en la presente memoria puede combinarse con, o ser adyuvante de, otra terapia. Los ejemplos no limitativos de otra terapia para CRC incluyen tratamiento quimioterapéutico, terapia de radiación, resección quirúrgica y terapia de anticuerpos, como se describe en la presente memoria. En un ejemplo específico, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se administran en combinación con agentes quimioterapéuticos. En otro ejemplo específico, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se administran como adyuvante con resección quirúrgica. Los anticuerpos monoclonales anti-PG también pueden usarse en combinación uno con otro.

[0031] Los individuos con tumores de CRC tienen frecuentemente niveles elevados de PG circulante (*por ejemplo,* en suero o plasma). De acuerdo con esto, los anticuerpos monoclonales anti-hPG pueden usarse para detectar niveles de PG para propósitos de diagnóstico de CRC. Además, en los pacientes ya diagnosticados con CRC, los anticuerpos monoclonales anti-hPG pueden usarse para seleccionar sujetos adecuados para recibir terapia anti-PG, o para monitorizar la eficacia del tratamiento. Como se describe en la presente memoria, un método para diagnosticar cáncer colorrectal en un sujeto comprende determinar si la cantidad de progastrina en una muestra del sujeto, por ejemplo una muestra de sangre o una muestra de suero, medida usando un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la presente descripción, está por encima de un nivel umbral. En una realización específica, el nivel umbral es 50 pM. En algunas realizaciones, se usan dos anticuerpos anti-PG, uno que reconoce una región C-terminal de PG y el otro que reconoce una región N-terminal de PG. En esta realización, uno o los dos de los anticuerpos N-terminal o C-terminal es un anticuerpo monoclonal anti-PG como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, se usan anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales y C-terminales. Los anticuerpos pueden ser, pero no necesitan ser, neutralizantes.

[0032] Para propósitos de monitorizar la eficacia del tratamiento, los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden usarse para determinar si el nivel de progastrina disminuye con el tiempo en muestras de un sujeto que se ha tratado o se está tratando para CRC comparando la cantidad de PG en muestras tomadas a diferentes tiempos. Las realizaciones específicas de anticuerpos anti-PG descritas en el párrafo precedente también pueden usarse en este ensayo.

[0033] También se proporcionan kits adecuados para realizar los diferentes métodos de diagnóstico, monitorización y otros descritos en la presente memoria. Dichos kits comprenderán típicamente un anticuerpo monoclonal anti-PG como se describe en la presente memoria y, opcionalmente anticuerpos anti-PG adicionales y/o reactivos adecuados para llevar a cabo el ensayo específico. En algunas realizaciones, uno o más anticuerpos anti-PG incluidos en el kit están marcados con un marcaje detectable, tal como un fluoróforo. En una realización específica, el kit incluye un anticuerpo anti-PG que se une específicamente a una región N-terminal de PG, un anticuerpo anti-PG que se

une específicamente a una región C-terminal de PG y, opcionalmente, reactivos adecuados para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico, en el que el anticuerpo N-terminal específico es un anticuerpo monoclonal anti-PG N-terminal como se describe en la presente memoria y/o el anticuerpo C-terminal específico es un anticuerpo monoclonal anti-PG C-terminal como se describe en la presente memoria.

[0034 Las características y ventajas de las diferentes invenciones descritas en la presente memoria serán más evidentes a partir de la descripción detallada siguiente de las realizaciones ejemplares de éstas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0035] La FIG. 1 proporciona las secuencias de aminoácidos de pre-progastrina, progastrina y productos del procesamiento de la progastrina incluyendo G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, y el péptido flanqueante C-terminal, CTFP.

[0036] La FIG. 2 proporciona las secuencias de polipéptido, y el polinucleótido correspondiente, de las cadenas V_H y V_L para anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplares: anti-hPG MAb 3 (SEQ ID NOS 16, 12, 17 y 13, respectivamente, en orden de aparición) (FIG 2A, 2B), anti-hPG MAb 4 (SEQ ID NOS 18, 14, 19 y 15, respectivamente, en orden de aparición) (FIG. 2C, 2D), anti-hPG MAb 8 (SEQ ID NOS 67, 59, 71 y 63, respectivamente, en orden de aparición) (FIG. 2E, 2F), anti-hPG Mab 13 (SEQ ID NOS 68, 60, 72 y 64, respectivamente, en orden de aparición) (FIG. 2G, 2H), anti-hPG MAb 16 (SEQ ID NOS 69, 61, 73 y 65, respectivamente, en orden de aparición) (FIG. 2I, 2J), y anti-hPG MAb 19 (SEQ ID NOS 70, 62, 74 y 66, respectivamente, en orden de aparición) (FIG. 2K, 2L), en los que las tres CDR de cada cadena están subrayadas.

[0037] Las FIG. 3A-C proporcionan gráficos que ilustran las afinidades relativas de unión (medidas como absorbancia a 492 nm) a concentraciones crecientes de anticuerpo (μg/mL) de anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplares, MAbs 1-4 (FIG. 3A); MAbs 5-14 y 20-23 (FIG. 3B); y MAbs 3 y 15-19 (FIG. 3C).

[0038] La FIG. 4 proporciona un gráfico que ilustra la proporción de absorbancia (densidad óptica) a 280 nm y 330 nm para cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG

murinos ejemplares diferentes comparado con una muestra control de albúmina de suero bovino (unidades arbitrarias).

[0039] Las FIG. 5A-C proporcionan gráficos que ilustran la unión de 23 anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplares diferentes a 25 ó 50 ng de hPG comparado con: tampón solo (control negativo), 250 ng de KLH (control negativo), y péptidos derivados del gen de la gastrina (50 y 250 ng de CTFP, G17, o G17-Gly (referido en la figura como "G-Gly"), como se indica. La FIG. 5A muestra la unión de anti-hPG MAbs 1-4, la FIG. 5B muestra la unión de anti-hPG MAbs 5-14 y 21-23, y la FIG. 5C muestra la unión de anti-hPG MAbs 3 y 15-20.

[0040] La FIG. 6 proporciona un gráfico que ilustra la unión de un anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal a hPG a concentraciones crecientes de anti-hPG MAb3.

[0041] La FIG. 7 proporciona gráficos que ilustran la proliferación de líneas celulares de CRC representativas tratadas con anticuerpos monoclonales anti-hPG como sigue: SW480, HCT-116, LS174T, como se indica, tratadas con anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplares MAb 3 y MAb 4 (FIG. 7A, 7B, 7C, respectivamente, mostrando el cambio en el número de células vivas al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0) con anticuerpo), o un anticuerpo policlonal anti-hPG (FIG. 7D, 7E, 7F, respectivamente, mostrando el cambio en el número de células vivas al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0) con anticuerpo); proliferación de la línea celular de CRC SW620 tratada con anti-hPG MAb 5 a MAb 23 (FIG. 7G, mostrando células vivas tratadas con anti-hPG como porcentaje del número de células tratadas con anticuerpo control al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0)); proliferación de células LS174T tratadas con anti-hPG MAb 8, 13, 14, 16, y 19 (FIG. 7H, mostrando células vivas tratadas con anti-hPG como porcentaje del número de células tratadas con anticuerpo control al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0)); y proliferación de células HCT-116 tratadas con anticuerpos monoclonales anti-hPG MAb 8, 13, 14, 16, 19 (FIG. 7I, mostrando células vivas tratadas con anti-hPG como porcentaje del número de células tratadas con anticuerpo control al final del tratamiento respecto al comienzo del tratamiento (T0)).

[0042] La FIG. 8 proporciona un gráfico que ilustra el número de células LS174T vivas a las 48 horas después de 4 tratamientos con un anticuerpo monoclonal control, anti-hPG MAb 8 (5μg/mL), anti- hPG MAb 8 pre-incubado con hPG, el anticuerpo control pre-incubado con hPG, o hPG solo.

[0043] La FIG. 9 proporciona gráficos que ilustran el número de tumores por ratón (FIG. 9A) y la longitud y altura medias del tumor (FIG. 9B) en ratones tratados con anticuerpos anti-hPG comparado con un anticuerpo policlonal control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES EJEMPLARES

Descripción Detallada

[0044] La progastrina (PG) se identificó por primera vez como el precursor de la gastrina, una hormona peptídica intestinal que estimula la secreción de ácido gástrico. La gastrina existe en varias formas moleculares diferentes (G17, G34, G17 extendido con glicina, G34 extendido con glicina) derivadas de la progastrina. *Véase* la FIG. 1. El gen de la gastrina codifica un producto de 101 aminoácidos, la preprogastrina. Una primera escisión elimina un péptido señal de 21 residuos de aminoácidos (subrayado en la FIG. 1) y resulta en PG, un péptido de 80 aminoácidos. La secuencia entendida conocida de la secuencia polipeptídica de la PG humana (hPG) se proporciona en SEQ ID NO:20. Como se ilustra en la FIG. 1, los residuos de aminoácidos de hPG están numerados de 1 a 80, siendo el residuo más amino la posición 1. Las secuencias en los primeros 40 aminoácidos de la progastrina se refieren como "N-terminales," mientras que las secuencias que están en el residuo 41 a 80 se refieren como "C-terminales."

[0045] Estudios recientes han mostrado que los niveles de progastrina están elevados en pacientes con CRC. Bajo condiciones fisiológicas normales, la progastrina representa menos del 10% del péptido total secretado en los seres humanos. En el cáncer colorrectal, los niveles de progastrina están significativamente elevados tanto en plasma como en tejido tumoral, posiblemente como resultado de una expresión incrementada del gen de la gastrina acoplado con un procesamiento incompleto del producto génico. Un estudio mostró niveles significativamente altos en suero de progastrina en pacientes con CRC comparado con pacientes control pero no una diferencia tal para las formas más procesadas de la gastrina (Siddheshwar *et al.*, 2001, *Gut* 48:47-52). En muestras de tumor

de CRC ensayadas, el 80-100% de las muestras mostró niveles incrementados de PG. *Véanse, por ejemplo*, Ciccotosto *et al.*, 1995, *Gastroenterology* 109:1142-1153; Baldwin *et al.*, 1998, *Gut* 42:581-584; Van Solinge, 1993, *Gastroenterology* 104:1099-1107. El papel de PG en CRC se ha sustanciado además por experimentos que muestran que los ratones que expresan PG humana recombinante tratados con el carcinógeno azoximetano tenían números significativamente mayores de focos de criptas aberrantes, adenomas, y adenocarcinomas en el colon comparado con ratones de tipo salvaje o ratones que expresan gastrinas amidadas (Singh *et al.* 2000, *Gastroenterology* 119:162-171).

[0046] Recientemente, Hollande *et al.*, demostraron que la progastrina estimula la ruta beta-catenina/Tcf4 reprimiendo ICAT, un regulador negativo de la señalización beta-catenina/Tcf4 y que el bloqueo de la progastrina da lugar a la expresión *de novo* de ICAT. *Véase* WO 2007/135542. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de operación, se cree que el bloqueo de la señalización de la progastrina da lugar a la represión de la proliferación inducida por beta-catenina/ Tcf4 como resultado de una expresión incrementada de ICAT. En ausencia de señalización continuada dependiente de PG, la proliferación celular se inhibe y se desencadena la diferenciación celular y/o muerte celular (incluyendo la apoptosis).

[0047] A pesar de la necesidad urgente de nuevas estrategias clínicas para el tratamiento y diagnóstico de CRC, la evidencia de que PG estimula la proliferación de células de tumor de CRC, y a pesar de la atención incrementada en terapias de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer, hasta la fecha, no hay publicaciones que demuestren que ningún anticuerpo monoclonal sea capaz de bloquear la proliferación de células tumorales dependiente de PG o incluso la unión de PG. Dichos anticuerpos, presentados en la presente memoria por primera vez, se han mostrado difíciles de desarrollar. Como un primer reto, los solicitantes encontraron que la progastrina humana recombinante, que puede usarse para generar anticuerpos policlonales anti-hPG, fue incapaz de inducir una respuesta inmunogénica monoclonal en ratones de ensayo. Por lo tanto, fue necesario diseñar inmunógenos usando sólo fragmentos peptídicos de PG para generar anticuerpos específicos para progastrina y no para otros productos del gen de la gastrina. Incluso una vez que los clones de hibridoma rindieron anticuerpos que se unían al péptido antigénico, se encontró que la unión al péptido no era predictiva de la

11

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

Anticuerpos monoclonales anti-hPG

[0048] Los solicitantes han descubierto antígenos peptídicos útiles para generar anticuerpos monoclonales anti-hPG. Los péptidos útiles para generar anticuerpos anti-hPG de la presente descripción comprenden secuencias específicas de la progastrina no encontradas en las formas más procesadas del polipéptido, tales como gastrinas extendidas con glicina o amidadas o CTFP, pero también pueden comprender secuencias que se encuentran en las formas procesadas de hPG. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se generan frente a un antígeno peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región N-terminal de hPG y se designan anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales. Una región antigénica ejemplar específica que puede usarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG N-terminales corresponde a los residuos 1 a 14 de hPG (SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 25)) acoplado con una secuencia conectora. En otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se generan frente a un antígeno peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región C-terminal de hPG y se designan anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales. Una región antigénica ejemplar específica que puede usarse para construir un inmunógeno útil

para obtener anticuerpos monoclonales anti-PG C-terminales corresponde a los residuos 55 a 80 de hPG (SEQ ID NO:27) acoplado a una secuencia conectora. *Véase* la Tabla 1.

[0049] Los anticuerpos monoclonales anti-PG de la presente descripción se unen a PG y son útiles para detectar y aislar PG de mezclas complejas. Además, los anticuerpos monoclonales anti-PG de la descripción son excepcionalmente adecuados para aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico para cáncer colorrectal. En varias realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG (1) se unen específicamente a PG frente a otros productos del gen de la gastrina, (2) tienen una alta afinidad para hPG, (3) inhiben la proliferación de células de cáncer colorrectal *in vitro* e *in vivo,* (4) reducen el tamaño y número de los tumores *in vivo*, (5) detectan PG en mezclas complejas que contienen otros productos derivados del gen de la gastrina.

[0050] El gen de la gastrina se expresa y procesa extensamente, para rendir varios productos proteicos que tienen papeles en la homeostasis normal. La progastrina, por otra parte, típicamente no es detectable en la circulación de los sujetos sanos. Los anticuerpos monoclonales de la presente descripción se pretende que estén dirigidos a la progastrina pero no a otros péptidos derivados del gen de la gastrina. De acuerdo con esto, los anticuerpos monoclonales anti-hPG se unen específicamente a la progastrina, de seres humanos y otros animales, pero no a otros productos del gen de la gastrina, tales como, pero no limitados a, gastrinas extendidas con glicina o amidadas o Péptido Flanqueante C-terminal (CTFP).

[0051] La especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG puede determinarse usando un ELISA como sigue. Se incuban placas de 96 pocillos toda la noche a 4°C con la concentración o concentraciones apropiadas del polipéptido de ensayo (por ejemplo, 25 y 50 ng de PG humana recombinante, y 50 y 250 ng de CTFP u otros productos derivados del gen de la gastrina) en Disolución Salina Tamponada con Fosfato (PBS), después de lo cual los pocillos se lavan tres veces con disolución de lavado (PBS y 0,1% Tween-20), y se incuban durante 2 horas a 22°C con 100 µL de disolución de bloqueo (PBS, 0,1% Tween-20, 0,1% Albúmina de Suero Bovino o hidrolizado de caseína) por pocillo. Después del bloqueo, los pocillos se lavan tres veces y se añade el anticuerpo que se va a ensayar (anticuerpo de ensayo). Se añaden a cada pocillo 100 µL del anticuerpo de

12

ensayo (a 0,3 a 1 ng/mL) en PBS y 0,1% Tween-20. Las placas se incuban durante 2 horas a 22°C, después de lo cual la disolución del anticuerpo de ensayo se desecha y se reemplaza, después de una etapa de lavado (3X 100 µL de disolución de lavado, como se ha indicado anteriormente), con disolución de bloqueo que contiene un anticuerpo secundario, un anticuerpo IgG (Fc) de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Después de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario, se añaden 100 µL de disolución de sustrato (*por ejemplo*,. Fast OPD, o Dihidrocloruro de *O*-Fenilendiamina, disponible en Sigma-Aldrich Co., preparado según las instrucciones del fabricante) a cada pocillo y se incuba en oscuridad durante 20 minutos a 22°C. La reacción se para por la adición de 50 µL de 4N ácido sulfúrico y se determina la cantidad de sustrato catalizada midiendo la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. La conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario (de ensayo) unido al antígeno. Los experimentos se hacen en duplicado y las medidas de DO se representan como una función de la concentración de antígeno. Los anticuerpos de ensayo se clasifican como específicos para PG si la D.O. medida es entre 0,2 y 1,5 para hPG y no hay una señal estadísticamente significativa por encima del fondo con CTFP o ninguno de los demás péptidos derivados del gen de la gastrina, en el que el fondo es la señal media de los pocillos control que sólo contienen PBS.

[0052] Se encontró que varios anticuerpos monoclonales anti-hPG de la presente descripción eran altamente específicos. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG presentan una especificidad 100 veces mayor para la progastrina comparado con los demás productos del gen de la gastrina. En dichas realizaciones, se requiere 100 veces más de antígeno (*por ejemplo*, gastrina extendida con glicina o amidada) para rendir la misma unión que la observada cuando el antígeno es la progastrina.

[0053] Otros métodos para determinar la unión incluyen, pero no están limitados a, un método inmunofluorescente, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un inmunoensayo con material marcado radiactivamente (RIA), un ELISA sandwich (Monoclonal Antibody Experiment Manual (publicado por Kodansha Scientific, 1987), Second Series Biochemical Experiment Course, Vol. 5, Immunobiochemistry Research Method, publicado por Tokyo Kagaku Dojin (1986)).

[0054] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG con alta afinidad para PG son deseables tanto para usos terapéuticos como de diagnóstico. Para determinados usos, tales como usos terapéuticos, es deseable una afinidad de al menos aproximadamente 100 nM, aunque pueden ser deseables los anticuerpos que tienen afinidades mayores, por ejemplo afinidades de al menos aproximadamente 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, 10 pM, 1 pM, o incluso mayores. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a hPG con una afinidad en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 100 nM, o una afinidad en el intervalo entre cualquiera de los valores anteriores.

[0055] La afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG para hPG puede determinarse usando técnicas muy conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria, tales como por ejemplo, pero no como limitación, ELISA, calorimetría isotérmica de titulación (ITC), BIAcore, Proteon, o ensayo de polarización fluorescente.

[0056] Usando antígenos de las regiones N- o C-terminales de hPG, pueden generarse anticuerpos que reconozcan diferentes epítopos de hPG. El epítopo reconocido por un anticuerpo monoclonal dependerá del antígeno particular usado para generar el anticuerpo y puede mapearse usando técnicas conocidas para el experto en la técnica, tales como escaneo de alanina y análisis SPOT (véase la sección de Ejemplos más adelante). Por ejemplo, el mapeo de epítopos revela que anti-hPG MAb 2 y MAb 4 se unen al mismo epítopo; anti-hPG MAb 1 y MAb 3 se unen aproximadamente al mismo epítopo; MAb 17, MAb 18, MAb 19, y MAb 20 se unen aproximadamente al mismo epítopo; MAb 15 y MAb 16 se unen aproximadamente al mismo epítopo; anti-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb 9, y MAb 12 se unen al mismo epítopo y se unen aproximadamente al mismo epítopo que anti-hPG MAb 10; y anti-hPG MAb 11 y MAb 14 se unen aproximadamente al mismo epítopo.

[0057] Si un anticuerpo monoclonal anti-hPG reconoce o no un epítopo particular puede determinarse usando un ensayo de competición como se describe en la presente memoria, en el que se conoce el epítopo unido por el anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-hPG compite con un anticuerpo de

referencia que se une a un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región N-terminal de hPG. En realizaciones específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG compiten con un anticuerpo de referencia que se une a un epítopo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEQ ID NO:28), residuos 9 a 14 de hPG (SEQ ID NO:29), residuos 4 a 10 de hPG (SEQ ID NO:30), residuos 2 a 10 de hPG (SEQ ID NO:31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEQ ID NO:32). En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-hPG compite con un anticuerpo de referencia que se une a un epítopo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una región C-terminal de hPG. En realizaciones específicas, los anticuerpos monoclonales anti-hPG compiten con un anticuerpo de referencia que se une a un epítopo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEQ ID NO:33), residuos 69 a 73 de hPG (SEQ ID NO:34), residuos 76 a 80 de hPG (SEQ ID NO:35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEQ ID NO:36).

[0058] Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden ser neutralizantes. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de operación, se piensa que, a través de la unión a PG, los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes bloquean o inhiben su capacidad de interaccionar con su o sus parejas de señalización. Esto, a su vez, inhibe una ruta de transducción de la señal en células de tumor colorrectal que de otra manera daría lugar a la proliferación, diferenciación celular reducida y muerte celular. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes se unen a una región N-terminal de hPG. En realizaciones específicas, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes compiten por la unión a PG con anti-hPG MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb 16, MAb 17, MAb 18, MAb 19, o MAb 20. En otras realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes se unen a una región C-terminal de hPG. En realizaciones específicas, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes compiten por la unión a PG con anti-hPG MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb21, MAb 22, o MAb23.

[0100] Un ensayo específico para ver si un anticuerpo monoclonal anti-PG es neutralizante puede llevarse a cabo como sigue. Se siembran células CRC LS174T en una placa de 6 pocillos, como se describe en el Ejemplo 7 más adelante, a aproximadamente 50,000 células por pocillo. Las células se tratan a intervalos de 12 horas durante 48 horas

con el anticuerpo monoclonal anti-PG de ensayo o un anticuerpo monoclonal control como se indica en el Ejemplo 7, a concentraciones de anticuerpo de aproximadamente 5 μg/mL. Un anticuerpo de ensayo se define como neutralizante en el ensayo, si el número de células de cáncer CRC tratadas con el anticuerpo de ensayo muestra una reducción estadísticamente significativa de al menos 10% en el número de células supervivientes comparado con el número de células tratadas con un anticuerpo control, no específico, usando un ensayo de dos colas de Mann-Whitney (con las diferencias consideradas como significativas cuando $p<0,05$). Los números de células totales se corrigen por el número de células al comienzo del periodo de tratamiento, referido como T0.

[0059] Tal y como se usa en la presente memoria, un anticuerpo (Ab) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular, e incluye anticuerpos policlonales, monoclonales, modificados por ingeniería genética y formas modificadas de otra manera de anticuerpos, incluyendo pro no limitado a anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos, incluyendo *por ejemplo*, fragmentos Fab', $F(ab')_2$, Fab, Fv, rIgG, y scFv. En varias realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG comprenden toda o una parte de una región constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la región constante es un isotipo seleccionado de: IgA (*por ejemplo*, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), e IgM.

[0060] El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se usa en la presente memoria no está limitado a anticuerpos producidos mediante la tecnología del hibridoma. Un anticuerpo monoclonal se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, por cualquier medio disponible o conocido en la técnica. Los anticuerpos monoclonales útiles con la presente descripción pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de exposición en fagos, o una combinación de éstas. En muchos usos de la presente descripción, incluyendo el uso *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-hPG en seres humanos y los ensayos de detección *in vitro*, pueden usarse adecuadamente anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados o humanos.

[0061] El término "scFv" se refiere a un anticuerpo de única cadena Fv en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo tradicional se han unido para formar una cadena.

[0062] Las referencias a "V_H" se refieren a la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv, o Fab. Las referencias a "V_L" se refieren a la región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Los anticuerpos (Abs) e inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras los anticuerpos presentan especificidad de unión para una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas semejantes a anticuerpos que carecen de especificidad de diana. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas nativas son habitualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo.

[0063] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR también se conocen como regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan el marco (FR). Como se conoce en la técnica, la posición /límite de aminoácidos que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de varias definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones en un dominio variable pueden verse como posiciones hipervariables híbridas ya que puede considerarse que estas posiciones están en una región hipervariable bajo un conjunto de criterios mientras que puede considerarse que están fuera de una región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también puede encontrarse en regiones hipervariables extendidas. La descripción proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones

FR, sobre todo adoptando una configuración de lámina β, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las CDR de cada cadena se mantienen muy cerca por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a la diana de los anticuerpos (*Véase* Kabat *et al.,* Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987).

[0064] Varios anticuerpos monoclonales anti-hPG que tienen una alta especificidad y afinidad para hPG y una buena actividad anti-tumoral se han identificado y sus CDR y cadenas variables pesada y ligera se han secuenciado. Los dominios variables de la cadena pesada y ligera murinos se refieren en la presente memoria como mV_H y mV_L seguido del número del anticuerpo monoclonal correspondiente, por ejemplo $mV_H.3$ y $mV_L.3$ para anti-hPG MAb3. Los anticuerpos monoclonales anti-hPG tienen tres CDR variables de cadena ligera y tres CDR variables de cadena pesada, referidas como V_H CDR1, 2, ó 3, y V_L CDR1, 2, ó 3, respectivamente, seguido del número del anticuerpo monoclonal anti-hPG ejemplar. Por ejemplo, V_L CDR1 de MAb 3 se indica como V_L CDR1.3 y V_H CDR1 de MAb 3 se indica como V_H CDR1.3. De manera similar, los dominios variables de cadena pesada y ligera humanos se refieren en la presente memoria como hV_H y hV_L seguido del número del anticuerpo monoclonal correspondiente.

[0065] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG generados frente a una parte N-terminal de hPG tienen tres CDR variables de cadena ligera y tres CDR variables de cadena pesada, en los que V_L CDR1 se selecciona de QSIVHSNGNTY ("V_L CDR 1.3"; SEQ ID NO:4), QSLVHSSGVTY ("V_L CDR 1.4"; SEQ ID NO:10), QSLLDSDGKTY ("V_L CDR 1.16"; SEQ ID NO:50), y SQHRTYT ("V_L CDR 1.19"; SEQ ID NO:51); V_L CDR2 se selecciona de KVS ("V_L CDR 2.3" y ("V_L CDR 2.4"; SEQ ID NO:5), LVS ("V_L CDR 2.16"; SEQ ID NO:53), y VKKDGSH ("V_L CDR 2.19"; SEQ ID NO:54); V_L CDR3 se selecciona de FQGSHVPFT ("V_L CDR 3.3"; SEQ ID NO:6), SQSTHVPPT ("V_L CDR 3.4"; SEQ ID NO:11), WQGTHSPYT ("V_L CDR 3.16"; SEQ ID NO:57), y GVGDAIKGQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEQ ID NO:58); V_H CDR1 se selecciona de GYIFTSYW ("V_H CDR 1.3"; SEQ ID NO:1), GYTFSSSW ("V_H CDR 1.4"; SEQ ID NO:7), GYTFTSYY ("V_H CDR 1.16"; SEQ ID NO:39), y GYSITSDYA ("V_H CDR 1.19"; SEQ ID NO:40); V_H CDR2 se selecciona de FYPGNSDS ("V_H CDR

2.3"; SEQ ID NO:2), FLPGSGST ("V_H CDR 2.4"; SEQ ID NO:8), INPSNGGT ("V_H CDR 2.16"; SEQ ID NO:43), y ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEQ ID NO:44); y V_H CDR3 se selecciona de TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEQ ID NO:3), ATDGNYDWFAY ("V_H CDR 3.4" SEQ ID NO:9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEQ ID NO:47), y AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEQ ID NO:48). *Véase* la Tabla 1A.

[0066] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG generados frente a una parte C-terminal de hPG tienen tres CDR variables de cadena ligera y tres CDR variables de cadena pesada, en los que V_L CDR1 se selecciona de KSLRHTKGITF ("V_L CDR 1.8"; SEQ ID NO:49) y QSLLDSDGKTY ("V_L CDR 1.13"; SEQ ID NO:50); V_L CDR2 se selecciona de QMS ("V_L CDR 2.8"; SEQ ID NO:52) y LVS ("V_L CDR 2.13"; SEQ ID NO:53); V_L CDR3 se selecciona de AQNLELPLT ("V_L CDR 3.8"; SEQ ID NO:55) y WQGTHFPQT ("V_L CDR 3.13"; SEQ ID NO:56); V_H CDR1 se selecciona de GFTFTTYA ("V_H CDR 1.8"; SEQ ID NO:37) y GFIFSSYG ("V_H CDR 1.13"; SEQ ID NO:38); V_H CDR2 se selecciona de ISSGGTYT ("V_H CDR 2.8"; SEQ ID NO:41) y INTFGDRT ("V_H CDR 2.13"; SEQ ID NO:42); y V_H CDR3 se selecciona de ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEQ ID NO:45) y ARGTGTY ("V_H CDR 3.13"; SEQ ID NO:46). *Véase* la Tabla 1B.

Tabla 1A

Anticuerpos Monoclonales Anti-hPG N-terminales

Inmunógeno	Hibridoma (Depósito#)	MAb	Secuencias CDR Murinas			Secuencias V_H y V_L Murinas		Secuencias V_H y V_L Humanizadas (proyectado)	
N1	43B9G11	MAb1							
N1	WE5H2G7	MAb2							
N2	6B5B11C10	MAb3	V_H CDR 1.3	GYIFTSYW	(SEQ ID NO:1)	mV_H 3	(SEQ ID NO.12)	hV_H 3	(SEQ ID NO:21)
			V_H CDR 2.3	FYPGNSDS	(SEQ ID NO:2)				
			V_H CDR 3.3	TRRDSPQY	(SEQ ID NO:3)				
			V_L CDR 1.3	QSIVHSNGNTY	(SEQ ID NO:4)	mV_L 3	(SEQ ID NO:13)	hV_L 3	(SEQ ID NO:22)
			V_L CDR 2.3	KVS	(SEQ ID NO:5)				
			V_L CDR 3.3	FQGSHVPFT	(SEQ ID NO:6)				
N2	20D2C3G2	MAb4	V_H CDR 1.4	GYTFSSSW	(SEQ ID NO:7)	mV_H 4	(SEQ ID NO:14)	hV_H 4	(SEQ ID NO:23)
			V_H CDR 2.4	FLPGSGST	(SEQ ID NO:8)				
			V_H CDR 3.4	ATDGNYDWFAY	(SEQ ID NO:9)				
			V_L CDR 1.4	QSLVHSSGVTY	(SEQ ID NO:10)	mV_L 4	(SEQ ID NO:15)	hV_L 4	(SEQ ID NO:24)
			V_L CDR 2.4	KVS	(SEQ ID NO:5)				
			V_L CDR 3.4	SQSTHVPPT	(SEQ ID NO:11)				
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb15							
N2	1E9D9B6	MAb16	V_H CDR 1.16	GYTFTSYY	(SEQ ID NO:39)	mV_H 16	(SEQ ID NO:61)	hV_H 16a	(SEQ ID NO:84)
			V_H CDR 2.16	INPSNGGT	(SEQ ID NO:43)			hV_H 16b	(SEQ ID NO:86)
			V_H CDR 3.16	TRGGYYPFDY	(SEQ ID NO:47)			hV_H 16c	(SEQ ID NO:88)
			V_L CDR 1.16	QSLLDSDGKTY	(SEQ ID NO:50)	mV_L 16	(SEQ ID NO:65)	hV_L 16a	(SEQ ID NO:85)
			V_L CDR 2.16	LVS	(SEQ ID NO:53)			hV_L 16b	(SEQ ID NO:87)
			V_L CDR 3.16	WQGTHSPYT	(SEQ ID NO:57)			hV_L 16c	(SEQ ID NO:89)
N2	1C8D10F5	MAb17							
N2	1A7C3F11	MAb18							

Tabla 1A

Anticuerpos Monoclonales Anti-hPG N-terminales

Inmunógeno	Hibridoma (Depósito#)	MAb	Secuencias CDR Murinas			Secuencias V_H y V_L Murinas	Secuencias V_H y V_L Humanizadas (proyectado)
N2	1B3B4F11	MAb19	V_H CDR 1.19	GYSITSDYA	(SEQ ID NO:40)	mV_H 19 (SEQ ID NO:62)	hV_H 19a (SEQ ID NO:90)
			V_H CDR 2.19	ISFSGYT	(SEQ ID NO:44)		hV_H 19b (SEQ ID NO:92)
			V_H CDR 3.19	AREVNYGDSYHFDY	(SEQ ID NO:48)		hV_H 19c (SEQ ID NO:94)
			V_L CDR 1.19	SQHRTYT	(SEQ ID NO:51)	mV_L 19 (SEQ ID NO:66)	hV_L 19a (SEQ ID NO:91)
			V_L CDR 2.19	VKKDGSH	(SEQ ID NO:54)		hV_L 19b (SEQ ID NO:93)
			V_L CDR 3.19	GVGDAIKGQSVFV	(SEQ ID NO:58)		hV_L 19c (SEQ ID NO:95)
N2	1C11F5E8	MAb20					

Inmunógeno N1 = SWKPRSQQPDAPLG Ahx Cys BSA, también representado como (SEQ ID NO:25) Ahx Cys BSA
Inmunógeno N2 = SWKPRSQQPDAPLG Ahx Cys KLH, también representado como (SEQ ID NO:25) Ahx Cys KLH

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

Tabla 1B

Anticuerpos Monoclonales Anti-hPG C-terminales

Inmunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Secuencias CDR Murinas			Secuencias V_H y V_L Murinas		Secuencias V_H y V_L Humanizadas (proyectado)	
C1	1B4A11D11 (I-4371)	MAb5							
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6							
C1	1B11E4B11 (I-4373)	MAb7							
C1	1C10D3B9	MAb8	V_H CDR 1.8	GFTFTTYA	(SEQ ID NO:37)	mV_H.8	(SEQ ID NO:59)	hV_H 8a	(SEQ ID NO:75)
			V_H CDR 2.8	ISSGGTYT	(SEQ ID NO:41)			hV_H 8b	(SEQ ID NO:77)
			V_H CDR 3.8	ATQGNYSLDF	(SEQ ID NO:45)			hV_H 8c	(SEQ ID NO:79)
			V_L CDR 1.8	KSLRHTKGITF	(SEQ ID NO:49)	mV_L.8	(SEQ ID NO:63)	hV_L 8a	(SEQ ID NO:76)
			V_L CDR 2.8	QMS	(SEQ ID NO:52)			hV_L 8b	(SEQ ID NO:78)
			V_L CDR 3.8	AQNLELPLT	(SEQ ID NO:55)			hV_L 8c	(SEQ ID NO:76)
C1	1D8F5B3	MAb9							
C1	1E1C7B4	MAb10							
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11							
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12							
C1	2C6C3C7	MAb13	V_H CDR 1.13	GFIFSSYG	(SEQ ID NO:38)	mV_H.13	(SEQ ID NO:60)	hV_H.13a	(SEQ ID NO:80)
			V_H CDR 2.13	INTFGDRT	(SEQ ID NO:42)			hV_H.13b	(SEQ ID NO:82)
			V_H CDR 3.13	ARGTGTY	(SEQ ID NO:46)				
			V_L CDR 1.13	QSLLDSDGKTY	(SEQ ID NO:50)	mV_L.13	(SEQ ID NO:64)	hV_L 13a	(SEQ ID NO:81)
			V_L CDR 2.13	LVS	(SEQ ID NO:53)			hV_L 13b	(SEQ ID NO:83)
			V_L CDR 3.13	WQGTHFPQT	(SEQ ID NO:56)				
C1	2H9F4B7	MAb14							
C2	1F11F5E10	MAb21							

Tabla 1B

Anticuerpos Monoclonales Anti-hPG C-terminales

Inmunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Secuencias CDR Murinas	Secuencias V_H y V_L Murinas	Secuencias V_H y V_L Humanizadas (proyectado)
C2	1F11F5G9	MAb22			
C2	1A11F2C9	MAb23			

Inmunógeno C1 = KLH Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, también representado como KLH Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO:27)
Inmunógeno C2 = DT Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, también representado como DT Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO:27)

En la Tabla 1B, todas las secuencias de aminoácidos están representadas usando la orientación convencional N→C. Para cada inmunógeno, el péptido progastrina se sintetizó con un conector de dos residuos de ácido aminohexanoico (Ahx) seguido de una cisteína, que se conjugó con un vehículo de hemocianina de lapa ("KLH") o toxina de difteria ("DT").

[0067] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena pesada V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.3, V_HCDR2.3 y V_HCDR3.3. En una realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_H.3 (SEQ ID NO:12). *Véase* la FIG. 2A.

[0068] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_LCDR1.3, V_LCDR2.3 y V_LCDR3.3. En una realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_L.3 (SEQ ID NO:13). *Véase* la FIG. 2B.

[0069] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.4, V_HCDR2.4 y V_HCDR3.4. En una realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a mV_H.4 (SEQ ID NO:14). *Véase* la FIG. 2C.

[0070] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_LCDR1.4, V_LCDR2.4 y V_LCDR3.4 En una realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_L.4 (SEQ ID NO:15). *Véase* la FIG. 2D.

[0071] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.8, V_HCDR2.8 y V_HCDR3.8. En una realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a mV_H.8 (SEQ ID NO:59). *Véase* la FIG. 2E.

[0072] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_L CDR1.8, V_L CDR2.8 y V_L CDR3.8. En una realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_L.8 (SEQ ID NO:63). *Véase* la FIG. 2F.

[0073] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.13, V_HCDR2.13 y V_HCDR3.13. En una realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a mV_H.13 (SEQ ID NO:60). *Véase* la FIG. 2G.

[0074] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_LCDR1.13, V_LCDR2.13 y V_LCDR3.13. En una realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_L.13 (SEQ ID NO:64). *Véase* la FIG. 2H.

[0077] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.16, V_HCDR2.16 y V_HCDR3.16. En una realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a mV_H.16 (SEQ ID NO:61). *Véase* la FIG. 2I.

[0076] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_LCDR1.16, V_LCDR2.16 y V_LCDR3.16. En una realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_L.16 (SEQ ID NO:65). *Véase* la FIG. 2J.

[0077] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.19, V_HCDR2.19 y V_HCDR3.19. En una realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia correspondiente a mV_H.19 (SEQ ID NO:62). *Véase* la FIG. 2K.

[0078] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_LCDR1.19, V_LCDR2.19 y V_LCDR3.19. En una realización específica, la cadena V_L del anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente mV_L.19 (SEQ ID NO:66). *Véase* la FIG. 2L.

[0079] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.3, V_HCDR2.3 y V_HCDR3.3 y las CDR de la cadena V_L son V_LCDR1.3, V_LCDR2.3 y V_LCDR3.3. En una realización específica, la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-PG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a mV_H.3 (SEQ ID NO: 12) y la cadena V_L tiene una secuencia correspondiente a mV_L.3 (SEQ ID NO:13).

[0080] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.4, V_HCDR2.4 y V_HCDR3.4 y las CDR de la cadena V_L son V_LCDR1.4, V_LCDR2.4 y V_LCDR3.4. En una realización específica, la cadena V_H del

anticuerpo monoclonal anti-hPG tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_H.4$ (SEQ ID NO:14) y una cadena V_L tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.4$ (SEQ ID NO:15).

[0081] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.8, V_HCDR2.8 y V_HCDR3.8 y las CDR de la cadena V_L son V_LCDR1.8, V_LCDR2.8 y V_LCDR3.8. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAb 8 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_H.8$ (SEQ ID NO:59) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.8$ (SEQ ID NO:63).

[0082] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.3, V_HCDR2.13 y V_HCDR3.13 y las CDR de la cadena V_L son V_LCDR1.13, V_LCDR2.13 y V_LCDR3.13. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAb 13 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_H.13$ (SEQ ID NO:60) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.13$ (SEQ ID NO:64).

[0083] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.16, V_HCDR2.16 y V_HCDR3.16 y las CDR de la cadena V_L son V_LCDR1.16, V_LCDR2.16 y V_LCDR3.16. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAb 16 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_H.16$ (SEQ ID NO:61) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.16$ (SEQ ID NO:65).

[0084] En algunas realizaciones, las CDR de la cadena V_H del anticuerpo monoclonal anti-hPG son V_HCDR1.19, V_HCDR2.19 y V_HCDR3.19 y las CDR de la cadena V_L son V_LCDR1.19, V_LCDR2.19 y V_LCDR3.19. En una realización específica, el anticuerpo monoclonal anti-hPG es anti-hPG MAb 19 descrito en la presente memoria y comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_H.19$ (SEQ ID NO:62) y una secuencia de aminoácidos correspondiente a $mV_L.19$ (SEQ ID NO:66).

[0085] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción incluyen tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y $F(ab')_2$) que son capaces de unirse específicamente a hPG. Los fragmentos Fab y

$F(ab')_2$ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación del animal o planta y pueden tener menos unión inespecífica a tejido que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.,* 1983, J. Nucl. Med. 24:316). Los fragmentos de anticuerpo son útiles por lo tanto en aplicaciones terapéuticas entre otras aplicaciones.

[0086] El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a la diana o variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv. Un fragmento "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a la diana. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en una asociación firme, no covalente (dímero V_H-V_L). Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a la diana en la superficie del dímero V_H-V_L. Frecuentemente, las seis CDR confieren especificidad de unión a la diana al anticuerpo. Sin embargo, en algunos casos incluso un único dominio variable (o mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específico para una diana) puede tener la capacidad de reconocer y unirse a la diana, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión completo. Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite a scFv formar la estructura deseada para la unión a la diana. Los "anticuerpos de dominio único" están compuestos por un único dominio V_H o V_L que presenta suficiente afinidad para hPG. En una realización específica, el anticuerpo de dominio único es un anticuerpo camelizado (*Véase, por ejemplo*, Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25–38).

[0087] El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH_1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH_1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por la escisión del puente disulfuro de las cisteínas bisagra del producto de digestión con pepsina $F(ab')_2$. Los acoplamientos

químicos adicionales de los fragmentos de anticuerpo son conocidos por los expertos en la técnica.

[0088] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden ser anticuerpos quiméricos. El término anticuerpo "quimérico" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina no humana, tal como anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulinas humanas, elegidas típicamente de un molde de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. *Véanse, por ejemplo*, Morrison, 1985, Science 229(4719):1202-7; Oi *et al.,* 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies *et al.,* 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; Pat. U.S. Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

[0089] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden ser humanizados. Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión a la diana de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana, y pueden referirse como "injertadas con CDR." El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la humanización de anticuerpos, incluyendo los métodos para diseñar anticuerpos humanizados, se conocen en la técnica. *Véanse, por ejemplo,* Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77 ; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; Riechmann *et al.,* 1988, Nature 332:323-7; Patentes U.S. Nos: 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370 de Queen *et al.*; EP239400; publicación PCT WO 91/09967; Patente U.S. No. 5.225.539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol.

20

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 U.S. No. 5.565.332, todas las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

[0090] Las secuencias para anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados se diseñaron a partir de anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos de la presente descripción como se describe en los Ejemplos más adelante. Las realizaciones específicas de anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que comprenden: (1) cualquiera de tres VL CDR y cualquiera de tres VH CDR descritas en la presente memoria; (2) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:21 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:22; (3) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:24; (4) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:75, 77, y 79 y una región variables de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:76 y 78; (5) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:80 y 82 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:81 y 83; (6) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:84, 86, y 88 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:85, 87, y 89; (7) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:90, 92, y 94 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:91, 93, y 95.

[0091] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden ser primatizados. El término "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los métodos para

producir anticuerpos primatizados son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

[0092] Incluidos en los anticuerpos monoclonales anti-hPG están los anticuerpos que compiten con un anticuerpo de referencia, tal como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal anti-hPG o cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-hPG descritos en la presente memoria. Los anticuerpos que compiten con los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción son útiles para varias aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Las realizaciones específicas de anticuerpos monoclonales anti-hPG de referencia adecuados incluyen los anticuerpos descritos en la presente memoria, por ejemplo, pero no como limitación, anticuerpos que comprenden cualesquiera tres VL CDR y cualesquiera tres VH CDR descritas en la presente memoria; anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:12 (mVH.3) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:13 (mVL.3); y anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:14 (mVH.4) y la cadena VL tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO:15 (mVL.4), anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:59 (mVH.8) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:63 (mVL.8); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:60 (mVH.13) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:64 (mVL.13); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:61 (mVH.16) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:65 (mVL.16); anticuerpos en los que la cadena VH tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:62 (mVH.19) y la cadena VL tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:66 (mVL.19) o cualquier combinación de cadenas VH y VL descritas en la presente memoria.

[0093] Los anticuerpos de referencia adecuados también incluyen anticuerpos producidos por un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3,

21

1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9; anticuerpos que se unen a un epítopo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEQ ID NO:28), residuos 9 a 14 de hPG (SEQ ID NO:29), residuos 4 a 10 de hPG (SEQ ID NO:30), residuos 2 a 10 de hPG (SEQ ID NO:31), o residuos 2 a 14 de hPG (SEQ ID NO:32); y anticuerpos que se unen a un epítopo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEQ ID NO:33), residuos 69 a 73 de hPG (SEQ ID NO:34), residuos 76 a 80 de hPG (SEQ ID NO:35), o residuos 67 a 74 de hPG (SEQ ID NO:36).

[0094] La capacidad para competir con un anticuerpo monoclonal de la presente descripción para unirse a PG, por ejemplo hPG, puede ensayarse usando un ensayo de competición como sigue. Se recubren placas de 96 pocillos con un anticuerpo de captura (anticuerpo policlonal o monoclonal que reconoce una región N o C terminal de la progastrina que difiere del epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal de referencia), a una concentración a elegir en el intervalo de 1-10 µg/ml, toda la noche a 4°C (0,1 a 1µg/pocillo). Después de bloquear con 0,1% Tween-20/0,1% BSA en PBS (tampón de bloqueo) durante 2h a 22°C, se añade progastrina humana recombinante a una concentración de 10pM a 1nM (10 a 1.000 pg/pocillo) y se incuba durante 2h a 22°C. Posteriormente, el anticuerpo monoclonal anti-hPG biotinilado de referencia o una mezcla que contiene el anticuerpo monoclonal de referencia se añade junto con concentraciones crecientes de anticuerpos de ensayo no marcados y se incuba durante 1 horas a 22°C. Después de lavar, la detección se lleva a cabo incubando durante 1h a 22°C con un sustrato fluorogénico para peroxidasa de rábano, seguido de la cuantificación de las unidades relativas de luz (RLU) en un luminómetro. Los ensayos se llevan a cabo en duplicado. Los anticuerpos que compiten con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia de la presente descripción inhiben la unión del anticuerpo de referencia a hPG. Un anticuerpo que se une al mismo epítopo que los anticuerpos control será capaz de competir eficazmente para la unión y así reducirá significativamente (por ejemplo, al menos un 50%) la unión del anticuerpo de referencia, como se manifiesta por una reducción en el marcaje unido. La reactividad de los anticuerpos de referencia (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante será el valor alto de control. El valor bajo de control se obtendrá incubando los anticuerpos de ensayo no marcados con

células que expresan la progastrina e incubando la mezcla célula/anticuerpo con anticuerpos control marcados de exactamente el mismo tipo, en el que ocurrirá la competición y la unión reducida de los anticuerpos marcados. En un ensayo de ensayo, una reducción significativa de la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de ensayo es indicativa de un anticuerpo de ensayo que reconoce sustancialmente el mismo epítopo.

[0095] La inhibición de la unión puede expresarse como una constante de inhibición, o Ki, que se calcula según la fórmula siguiente:

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

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

[0096] En varias realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-hPG no marcado de la descripción reduce la unión del anticuerpo de referencia marcado al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, un 100%, o un porcentaje en el intervalo entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción reduce la unión del anticuerpo de referencia marcado un 50% a 70%) cuando el anticuerpo monoclonal anti-hPG se usa a una concentración de 0,01 μg/ml, 0,08 μg/ml, 0,4 μg/ml, 2 μg/ml, 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml o a una concentración en el intervalo entre cualquiera de los valores anteriores (por ejemplo, a una concentración en el intervalo de 2 μg/ml a 10 μg/ml).

[0097] En la realización de un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo de referencia y cualquier anticuerpo de ensayo (independientemente de especie o isotipo), se puede marcar en primer lugar la referencia con un marcaje detectable, tal como biotina o un marcaje enzimático (o incluso radiactivo) para permitir la identificación posterior. En este caso, el anticuerpo de referencia marcado (en concentraciones fijas o crecientes) se incuba con una cantidad conocida de progastrina. El anticuerpo de ensayo no marcado

se añade al complejo pre-unido de progastrina y el anticuerpo marcado. Se mide la intensidad del marcaje unido. Si el anticuerpo de ensayo compite con el anticuerpo marcado para la unión a un epítopo superpuesto, la intensidad disminuirá respecto a la unión del anticuerpo control marcado en ausencia del anticuerpo de ensayo.

[0098] Los ensayos de competición son conocidos y pueden adaptarse para rendir resultados comparables con el ensayo descrito anteriormente. El ensayo puede ser uno cualquiera de un rango de ensayos inmunológicos basados en la competición de anticuerpos, y los anticuerpos de referencia se detectarán mediante la detección de su marcaje, *por ejemplo*, usando estreptavidina en el caso de anticuerpos biotinilados o usando un sustrato cromogénico respecto a un marcaje enzimático (tal como sustrato 3,3'5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con la enzima peroxidasa) o simplemente detectando un marcaje radiactivo o un marcaje fluorescente.

[0099] También se incluyen en la presente memoria anticuerpos monoclonales anti-hPG que están derivatizados, modificados covalentemente, o conjugados con otras moléculas, para usarse en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Por ejemplo, pero no como limitación, los anticuerpos derivatizados incluyen anticuerpos que han sido modificados, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, *etc.* Cualesquiera de numerosas modificaciones químicas pueden realizarse por técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, *etc.* Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

[0100] En otro ejemplo, los anticuerpos de la presente descripción pueden unirse a restos de poli(etilenglicol) (PEG). En una realización específica, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y los restos PEG están unidos mediante cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional terminal de aminoácidos localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino libre, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Dichos aminoácidos pueden estar presentes de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse por ingeniería en el fragmento usando métodos de ADN recombinante. *Véase,* por ejemplo la Patente U.S. No. 5.219.996. Pueden usarse

múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG. Los restos PEG pueden unirse covalentemente mediante un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se usa un grupo tiol como el punto de unión, pueden usarse restos efectores apropiadamente activados, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína.

[0101] En un ejemplo específico, un conjugado de un anticuerpo monoclonal anti-hPG es un fragmento Fab' modificado que está PEGilado, *es decir*, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente a él, *por ejemplo*, según el método descrito en EP0948544. Véanse también Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications, (J. Milton Harris y S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); y Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam y A. Dent, eds., Grove Publishers, Nueva York, 1998); y Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531-545. El PEG puede estar unido a un cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab' modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amino del residuo de lisina puede unirse un polímero metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab' puede ser por lo tanto aproximadamente 40.000 Da.

[0102] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG incluyen anticuerpos marcados, útiles en aplicaciones de diagnóstico. Los anticuerpos pueden usarse para el diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de una diana de interés en células específicas, tejidos o suero; o para monitorizar el desarrollo o progresión de una respuesta inmunológica como parte de un procedimiento de ensayo clínico, *por ejemplo,* para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable o "marcaje." Un marcaje puede conjugarse directamente o indirectamente con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción. El marcaje puede ser detectable por sí mismo (*por ejemplo*, marcajes con radioisótopos, marcajes isotópicos, o marcajes fluorescentes) o, en el caso de un marcaje

enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando varias tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al anticuerpo (o fragmento de éste) o indirectamente, mediante un intermediario (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Los ejemplos de marcajes enzimáticos incluyen luciferasas (*por ejemplo*, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; Patente U.S. No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (*por ejemplo*, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y semejantes. Los ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo, cloruro de dimetilamina-1-nafalensulfonilo, o ficoeritrina y semejantes; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecuorina; los ejemplos de materiales isotópicos adecuados incluyen ^{13}C, ^{15}N, y deuterio; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In o ^{99}Tc.

[0103] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de todas las especies de origen están incluidos en la presente invención. Los anticuerpos naturales ejemplares no limitantes incluyen anticuerpos derivados de seres humanos, simios, pollo, cabras, conejos y roedores (*por ejemplo*, ratas, ratones y hámsters) (*Véanse, por ejemplo*, Lonberg *et al.*, WO93/12227; Pat. U.S. No. 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, WO91/10741; Pat. U.S. No. 6.150.584, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad). Los anticuerpos naturales son anticuerpos producidos por un animal huésped después de haber sido inmunizado con un antígeno, tal como un polipéptido.

Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

[0104] La presente descripción engloba moléculas de ácido nucleico que codifican genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas para anticuerpos monoclonales anti-hPG, vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos y células huésped capaces de producir los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción.

[0105] Un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción puede prepararse por la expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, una célula huésped se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de manera que las cadenas ligera y pesada se expresan en la célula huésped y, opcionalmente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, medio del cual pueden recuperarse los anticuerpos. Las metodologías de ADN recombinante estándar se usan para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Segunda Edición (Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. *et al.,* eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la Patente U.S. No. 4.816.397.

[0106] Para generar ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos monoclonales anti-hPG, se obtienen en primer lugar fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Estos ADN pueden obtenerse por amplificación y modificación de ADN de línea germinal o ADNc que codifica secuencias variables de cadena ligera y pesada, por ejemplo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera se conocen en la técnica (*Véanse, por ejemplo*, Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77 ; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBASE"; *véanse también* Kabat, E. A. *et al.,* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department

of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson *et al.,* 1992, J. Mol. Biol. 22T:116-198; y Cox *et al.,* 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836; los contenidos de cada una de ellas se incorporan en la presente memoria por referencia).

[0107] Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L relacionados con el anticuerpo monoclonal anti-hPG, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H se une de manera operativa a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. El término "unido de manera operativa," tal y como se usa en este contexto, se pretende que signifique que los dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

[0108] El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa por unión de manera operativa del ADN que codifica V_H con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada (CH_1, CH_2, CH_3 y, opcionalmente, CH_4). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (*Véase, por ejemplo,* Kabat, E.A., *et al.,* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero en determinadas realizaciones es una región constante de IgG_1 o IgG_4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse de manera operativa con otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante CH_1 de cadena pesada.

[0109] El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) por la unión de manera operativa del ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la

región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (*Véase, por ejemplo,* Kabat, E. A., *et al.,* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición (U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)) y los fragmentos de ADN que engloban estas regiones pueden obtenerse por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero en determinadas realizaciones es una región constante kappa. Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen de manera operativa con otro fragmento que codifica un conector flexible, *por ejemplo*, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4\text{~}Ser)_3$ (SEQ ID NO: 99), de manera que las secuencias de V_H y V_L pueden expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el conector flexible (*Véanse, por ejemplo,* Bird *et al.,* 1988, Science 242:423-426; Huston *et al.,* 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554).

[0110] Para expresar los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción, los ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa, obtenidos como se ha descrito anteriormente, se insertan en vectores de expresión de manera que los genes están unidos de manera operativa con secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, el término "unido de manera operativa" se pretende que signifique que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción en el vector cumplen su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de la cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

[0111] Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (*por ejemplo*, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de la cadena ligera o pesada relacionadas con el anticuerpo monoclonal anti-hPG, el vector de expresión puede portar

ya secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia para convertir las secuencias V_H y V_L relacionadas con el anticuerpo monoclonal anti-hPG en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera, respectivamente, de manera que el segmento V_H está unido de manera operativa al o a los segmentos CH en el vector y el segmento V_L está unido de manera operativa al segmento CL en el vector. Además o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal está unido en marco con el extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

[0112] Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la descripción portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" se pretende que incluya promotores, amplificadores y otros elementos de control de la expresión (*por ejemplo*, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, *etc.* Las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o amplificadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/amplificador CMV), Virus de Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/amplificador SV40), adenovirus, (*por ejemplo*, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una mayor descripción de los elementos reguladores virales, y secuencias de éstos, *véanse, por ejemplo,* Patente U.S.

No. 5.168.062 por Stinski, Patente U.S. No. 4.510.245 por Bell *et al.,* y Patente U.S. No. 4.968.615 por Schaffner *et al.*

[0113] Además de los genes de cadena de anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la descripción pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (*por ejemplo*, orígenes de replicación) y genes de marcadores seleccionables. El gen de marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que el vector se ha introducido (*Véanse, por ejemplo,* Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas por Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen de marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes de marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usarse en células huésped DHFR$^-$ con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418). Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped por técnicas estándar. Las distintas formas del término "transfección" se pretende que engloben una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una células huésped procariota o eucariota, *por ejemplo*, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y semejantes.

[0114] Es posible expresar los anticuerpos de la descripción en células huésped procariotas o eucariotas. En determinadas realizaciones, la expresión de los anticuerpos se realiza en células eucariotas, *por ejemplo*, células huésped de mamíferos, para la secreción óptima de un anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo. Las células huésped de mamíferos ejemplares para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la descripción incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CHO DHFR$^-$, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, *por ejemplo*, como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de

26

mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permtir la expresión del anticuerpo en la células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se crecen las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándar. Las células huésped también pueden usarse para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que las variaciones del procedimiento anterior están en el alcance de la presente descripción. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo monoclonal anti-hPG de esta descripción.

[0115] La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para eliminar parte o todo el ADN que codifica una o las dos cadenas ligera y pesada que no es necesaria para la unión a hPG. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas truncadas de ADN también están englobadas por los anticuerpos de la descripción.

[0116] Para la expresión recombinante de un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción, la célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la descripción, un primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos o cada uno puede contener un marcador seleccionable separado. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera.

[0117] Una vez que un ácido nucleico codifica una o más partes de un anticuerpo monoclonal anti-hPG, pueden introducirse alteraciones o mutaciones adicionales en la secuencia codificadora, por ejemplo para generar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos con diferentes secuencias CDR, anticuerpos con una afinidad reducida para el receptor Fc o anticuerpos de diferentes subclases.

[0118] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción también pueden producirse por síntesis química (*por ejemplo,* por los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Los anticuerpos

variantes también pueden generarse usando una plataforma sin células (*Véase, por ejemplo,* Chu *et al.*, Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals).

[0119] Una vez que se ha producido un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (*por ejemplo*, cromatografía de columna de intercambio iónico, de afinidad y de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la presente descripción o fragmentos de éstos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente memoria o conocidas de otra manera en la técnica para facilitar la purificación.

[0120] Una vez aislado, el anticuerpo monoclonal anti-hPG puede, si se desea, purificarse adicionalmente, *por ejemplo*, por cromatografía líquida de alto rendimiento (*Véase, por ejemplo,* Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), o por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex^{TM} 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia).

[0121] La presente descripción proporciona células huésped capaces de producir anticuerpos monoclonales anti-hPG. Las células huésped pueden ser células modificadas por ingeniería usando técnicas de ADN recombinante para expresar genes que codifican genes de cadena pesada y ligera o hibridomas derivados de un organismo adecuado y seleccionados para la capacidad de producir los anticuerpos deseados.

[0122] Las células huésped capaces de producir anticuerpos monoclonales anti-PG pueden ser hibridomas. Los métodos para generar hibridomas son conocidos en la técnica (*véase, por ejemplo,* Kohler y Milstein, 1975, Nature 256:495) y un ejemplo se proporciona más adelante. Generalmente, un animal huésped, tal como un ratón se inmuniza con un inmunógeno, tal como un péptido de interés, para inducir el desarrollo de linfocitos, por ejemplo células del bazo, que producen anticuerpos capaces de unirse específicamente al inmunógeno. Alternativamente, los linfocitos aislados, incluyendo células del bazo, células de ganglios linfáticos o linfocitos de sangre periférica, pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada, tal

como una línea celular de mieloma, usando un agente de fusión adecuado (por ejemplo, polietilen glicol), para formar una línea celular de hibridoma. Las líneas celulares inmortalizadas adecuadas pueden ser de origen mamífero, tal como murino, bovino o humano. Las células de hibridoma se cultivan en cualquier medio adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células no inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, cuando se usan las células parentales que carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), las fusiones pueden crecerse en medio que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio "HAT") que inhibe el crecimiento de las células parentales, no fusionadas.

[0123] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales tienen CDR de cadena ligera variable (V_L) que corresponden a la V_L del anticuerpo monoclonal que se puede obtener de los hibridomas 43B9G11 (que producen anti-hPG MAb 1), WE5H2G7 (que producen anti-hPG MAb 2), 6B5B11C10 (que producen anti-hPG MAb 3), 20D2C3G2 (que producen anti-hPG MAb 4), 1E9A4A4 (que producen anti-hPG MAb 15), 1E9D9B6 (que producen anti-hPG MAb 16), 1C8D10F5 (que producen anti-hPG MAb 17), 1A7C3F11 (que producen anti-hPG MAb 18), 1B3B4F11 (que producen anti-hPG MAb 19), y 1C11F5E8 (que producen anti-hPG MAb 20).

[0124] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales tienen CDR de V_L y V_H que corresponden a las CDR de V_L y V_H de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de los hibridomas anteriores.

[0125] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales tienen CDR de V_L que corresponden a la V_L del anticuerpo monoclonal que se puede obtener de los hibridomas 1B4A11D11 (que producen anti-hPG MAb 5), 1B6A11F2 (que producen anti-hPG MAb 6), 1B11E4B11 (que producen anti-hPG MAb 7), 1C10D3B9 (que producen anti-hPG MAb 8), 1D8F5B3 (que producen anti-hPG MAb 9), 1E1C7B4 (que producen anti-hPG MAb 10), 2B4C8C8 (que producen anti-hPG MAb 11), 2B11E6G4 (que producen anti-hPG MAb 12), 2C6C3C7 (que producen anti-hPG MAb 13), 2H9F4B7 (que producen anti-hPG MAb 14), 1F11F5E10 (que producen anti-hPG MAb 21), 1F11F5G9 (que producen anti-hPG MAb 22), y 1A11F2C9 (que producen anti-hPG MAb 23).

[0126] El algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales tienen CDR de VL y VH que corresponden a las CDR de VL y VH de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de los hibridomas anteriores.

[0127] En una realización, se proporciona una célula huésped capaz de producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:12 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:13. En una realización, se proporciona una célula huésped capaz de producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:14 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:15. En una realización, se proporciona una célula huésped capaz de producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:59 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:63. En una realización, se proporciona una célula huésped capaz de producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:60 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:64. En una realización, se proporciona una célula huésped capaz de producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:61 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:65. En una realización, se proporciona una célula huésped capaz de producir un anticuerpo anti-hPG que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:62 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:66.

[0128] En algunas realizaciones, se proporciona una célula huésped de la descripción que comprende un ácido nucleico seleccionado de: una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NOs:12, 14, 59, 60, 61, y 62; y un ácido nucleico seleccionado de: una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NOs:13, 15, 63, 64, 65, y 66. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada está codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de: SEQ ID NOs:16, 18, 67, 68, 69 y 70. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera está codificada por una secuencia de ácido nucleico seleccionada de: SEQ ID NOs:17, 19, 71, 72, 73, y 74.

[0129] En algunas realizaciones, se proporcionan secuencias polinucleotídicas que codifican una región variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal anti-hPG humanizado. Las realizaciones específicas incluyen polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:21, 23, 75, 77, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, y 94. En algunas realizaciones, se proporcionan secuencias polinucleotídicas que codifican una región variable de cadena ligera de un anticuerpo monoclonal anti-hPG humanizado. Las realizaciones específicas incluyen polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:22, 24, 76, 78, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, y 95.

Actividades biológicas de los anticuerpos monoclonales anti-hPG

[0130] Se ha implicado a PG en la supervivencia y/o proliferación de células de tumor de CRC. Aunque no se pretende la vinculación a ninguna teoría de operación, se piensa que, a través de la unión a PG, los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes bloquean o inhiben la capacidad de PG de interaccionar con su o sus parejas de señalización. Esto, a su vez, bloquea o inhibe las respuestas celulares a la progastrina, tal como proliferación celular, diferenciación celular reducida y/o muerte celular reducida, y/o crecimiento tumoral. Como consecuencia de estas actividades, los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes de la descripción pueden usarse en una variedad de contextos *in vitro*, *in vivo*, y *ex vivo* para unirse a PG y bloquear la señalización dependiente de PG.

[0131] De acuerdo con esto, la descripción proporciona métodos para inhibir las respuestas dependientes de PG en células de CRC. Generalmente, los métodos comprenden poner en contacto una célula de CRC con, o exponer una población de células a, un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante en una cantidad eficaz para inhibir una o más de las respuestas inducidas por PG de células de CRC, por ejemplo proliferación y/o supervivencia de células de CRC. La proliferación, o inhibición de ésta, *in vitro* e *in vivo* puede determinarse según los ensayos para medir incrementos en el número de células, número de tumores o tamaño de los tumores en el tiempo. Los ensayos para la inhibición de la proliferación de células y tumores son muy conocidos en la técnica.

[0132] El bloqueo de la señalización dependiente de PG puede inhibir la supervivencia de las células de CRC mediante el incremento de la muerte celular. La inhibición de la supervivencia de las células de CRC *in vitro* o *in vivo* puede determinarse midiendo la reducción del número de células de cáncer de hígado en el tiempo (*por ejemplo*, 24 ó 48 horas). Los ensayos para muerte celular son muy conocidos en la técnica. Además, un ejemplo de un ensayo de supervivencia celular se proporciona en la presente memoria.

[0133] Los estudios sugieren además que la inhibición de la señalización dependiente de PG en células de tumor de CRC puede inhibir la supervivencia de las células de CRC desencadenando la muerte celular programada, o apoptosis. La inducción de la apoptosis puede determinarse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a, medir cambios en la expresión de genes que tienen actividad pro o anti-apoptótica. Por ejemplo, un incremento de la expresión en el tiempo (*por ejemplo*, 48 horas) de un gen pro-apoptótico, tal como, por ejemplo, Bax, es indicativo de un incremento de la apoptosis. De manera similar, una disminución de la expresión en el tiempo (*por ejemplo,* 72 ó 96 horas) de un gen anti-apoptótico, tal como, por ejemplo, pero no como limitación, Bcl-2, es indicativa de un incremento de la apoptosis. Las técnicas para medir cambios en la expresión génica, tal como PCR cuantitativa en tiempo real, son muy conocidas en la técnica. *Véase, por ejemplo,* Hollande *et al.*, WO 2007/135542.

[0134] La inhibición de la señalización dependiente de progastrina también estimula la diferenciación celular. De acuerdo con esto, los métodos para inhibir la proliferación y/o supervivencia de las células de CRC comprende administrar una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante eficaz para inducir la diferenciación de las células de CRC *in vitro* o *in vivo*. La diferenciación de las células de CRC puede determinarse midiendo incrementos en el tiempo (*por ejemplo,* 24 ó 48 horas) de la expresión de marcadores genéticos para la diferenciación celular, tales como, por ejemplo, pero no como limitación, Muc-2 u otros marcadores para células intestinales diferenciadas (*por ejemplo,* células caliciformes). Los cambios en la expresión génica pueden medirse por cualquier medio conocido en la técnica. *Véase, por ejemplo,* Hollande *et al.*, WO 2007/135542. También pueden ensayarse otros genes cuya expresión o represión sea dependiente de PG, tales como ICAT, usando métodos estándar. *Véase id.*

Composiciones farmacéuticas

[0135] Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden formularse en composiciones. Opcionalmente, las composiciones pueden comprender uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los segundos agentes terapéuticos descritos más adelante, se proporcionan en la presente memoria. Las composiciones se suministrarán habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que incluirá normalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado para administrarla a un paciente).

[0136] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción pueden administrarse a un paciente por una variedad de rutas tales como ruta oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intraocular, tópica, intratecal e intracerebroventricular. La ruta más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del anticuerpo particular, del sujeto y de la naturaleza y gravedad de la enfermedad y de la condición física del sujeto. El anticuerpo puede formularse como una disolución acuosa y administrarse por inyección subcutánea.

[0137] Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contiene una cantidad predeterminada de un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción por dosis. Dicha unidad puede contener por ejemplo pero sin limitación 5 mg a 5 g, por ejemplo 10 mg a 1 g, ó 20 a 50 mg. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para usarse en la descripción pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo, *por ejemplo*, de la afección que se va a tratar o de la ruta de administración.

[0138] Las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales típicamente empleados en la técnica (todos los cuales se refieren en la presente memoria como "vehículos"), *es decir,* agentes tamponadores, agentes estabilizadores, conservantes, isotonificadores, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos misceláneos. *Véase*, Remington's

Pharmaceutical Sciences, 16a edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

[0139] Los agentes tamponadores ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes en una concentración que varía de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponadores adecuados para usarse con la presente descripción incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de éstos tales como tampones citrato (*por ejemplo,* mezcla de citrato de monosodio-citrato de disodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de trisodio, mezcla de ácido cítrico-citrato de monosodio, *etc.*), tampones succinato (*por ejemplo,* mezcla de ácido succínico- succinato de monosodio, mezcla de ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico-sucinato de disodio, *etc.*), tampones tartrato (*por ejemplo*, mezcla de ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico-hidróxido de sodio, *etc.*), tampones fumarato (*por ejemplo*, mezcla de ácido fumárico-fumarato de monosodio, mezcla de ácido fumárico-fumarato de disodio, mezcla de fumarato de monosodio-fumarato de disodio, *etc.*), tampones gluconato (*por ejemplo*, mezcla de ácido glucónico-gliconato de sodio, mezcla de ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico-gliconato de potasio, *etc.*), tampón oxalato (*por ejemplo*, mezcla de ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, *etc.*), tampones lactato (*por ejemplo*, mezcla de ácido láctico-lactato de sodio, mezcla de ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico-lactato de potasio, *etc.*) y tampones acetato (*por ejemplo*, mezcla de ácido acético-acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, *etc.*). Además, pueden usarse tampones fosfato, tampones histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

[0140] Pueden añadirse conservantes para retrasar el crecimiento microbiano y pueden añadirse en cantidades que van de 0,2%-1% (p/v). Los conservantes adecuados para usarse con la presente descripción incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, cloruro de octadecildimetilbencil amonio, haluros de benzalconio (*por ejemplo*, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio, y alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, y 3-pentanol. Los isotonificantes conocidos algunas veces como "estabilizadores" pueden

30

añadirse para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente descripción e incluyen alcoholes azúcar polihídricos, por ejemplo alcoholes azúcar trihídricos o mayores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función desde un agente de volumen hasta un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda en la prevención de la desnaturalización o adherencia a la pared del contenedor. Los estabilizadores típicos pueden ser alcoholes azúcar polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, *etc.*, azúcares orgánicos o alcoholes azúcar, tales como lactosa, trealosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisitol, galactitol, glicerol y semejantes, incluyendo ciclitoles tales como inositol; polietilen glicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tioctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (*por ejemplo*, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona, monosacáridos, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 partes en peso del peso de la proteína activa.

[0141] Los tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes de humectación") pueden añadirse para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica frente a la agregación inducida por la agitación, lo que también permite que la formulación pueda exponerse a estrés de cizalla superficial sin causar la desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, *etc.*), polioxámeros (184, 188, *etc.*), Polioles plurónicos, monoéteres de polioxietilen sorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, *etc.*). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, por ejemplo aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

[0142] Los excipientes misceláneos adicionales incluyen agentes de volumen (*por ejemplo*, almidón), agentes quelantes (*por ejemplo*, EDTA), antioxidantes (*por ejemplo*, ácido ascórbico, metionina, vitamina E), y codisolventes.

[0143] Los anticuerpos monoclonales anti-PG pueden administrarse individualmente, como mezclas de uno o más anticuerpos monoclonales anti-PG, mezclados o en combinación con otros agentes útiles para tratar CRC, o como adyuvantes de otra terapia para CRC. Los ejemplos de terapias de combinación y adyuvantes adecuadas se proporcionan más adelante.

[0144] La presente descripción engloba kits farmacéuticos que contienen anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes (incluyendo conjugados de anticuerpo) de la descripción. El kit farmacéutico es un envase que comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante (*por ejemplo*, bien en forma liofilizada o como una disolución acuosa) y uno o más de los siguientes:

Un segundo agente terapéutico, por ejemplo como se describe más adelante;
Un dispositivo para administrar el anticuerpo monoclonal anti-hPG, por ejemplo una pluma, aguja y/o jeringa; y
Agua o tampón de grado farmacéutico para resuspender el anticuerpo si el anticuerpo está en forma liofilizada.

[0145] Cada dosis unitaria del anticuerpo monoclonal anti-hPG puede estar envasada separadamente y un kit puede contener una o más dosis unitarias (*por ejemplo*, dos dosis unitarias, tres dosis unitarias, cuatro dosis unitarias, cinco dosis unitarias, ocho dosis unitarias, diez dosis unitarias o más). En una realización específica, la una o más dosis unitarias están contenidas cada una en una jeringa o pluma.

Dosificaciones eficaces

[0146] Los anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes, las composiciones de éstos, se usarán generalmente en una cantidad eficaz para conseguir el resultado pretendido, por ejemplo una cantidad eficaz para tratar CRC en un sujeto que lo necesite. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monoclonales anti-PG neutralizantes pueden administrarse a pacientes (*por ejemplo*, sujetos humanos) a

dosificaciones terapéuticamente eficaces. Tal y como se usa en la presente memoria, una dosificación "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que confiere un beneficio terapéutico. En el contexto de la terapia de CRC, un beneficio terapéutico significa cualquier mejoría de CRC, incluyendo una cualquiera de, o combinación de, parar o retrasar la progresión de CRC (*por ejemplo*, de un estadio del cáncer colorrectal al siguiente), parar o retardar el empeoramiento o deterioro de los síntomas o signos de CRC, reducir la gravedad de CRC, inducir la remisión de CRC, inhibir la proliferación de células de tumor de CRC, el tamaño del tumor de CRC o el número de tumores de CRC o reducir los niveles séricos de PG.

[0147] La cantidad de anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante administrada dependerá de una variedad de factores, incluyendo la naturaleza y estadio del CRC que se está tratando, la forma, ruta y sitio de administración, el régimen terapéutico (*por ejemplo*, si se usa un segundo agente terapéutico), la edad y condición del sujeto particular que se está tratando, la sensibilidad del pacientes que se está tratando a anticuerpos monoclonales anti-PG. La dosificación apropiada la puede determinar fácilmente un experto en la técnica. Finalmente, un médico determinará las dosificaciones apropiadas que se van a usar. Esta dosificación puede repetirse tan frecuentemente como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios la cantidad y/o frecuencia de la dosificación puede alterarse o reducirse, según la práctica clínica normal. La dosificación y régimen de tratamiento adecuados pueden establecerse monitorizando el progreso de la terapia usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica.

[0148] Las dosificaciones eficaces pueden estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis inicial para usarse en animales puede formularse para conseguir una concentración circulante en sangre o suero de anticuerpo monoclonal anti-PG que está en o por encima de la afinidad de unión del anticuerpo para la progastrina como se mide *in vitro*. El cálculo de las dosificaciones para conseguir dichas concentraciones circulantes en sangre o suero teniendo en cuenta la biodisponibilidad del anticuerpo particular está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Como guía, el lector se refiere a Fingl & Woodbury, "General Principles" en *Goodman and*

Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Capítulo 1, última edición, Pagamonon Press, y las referencias citadas en ella.

[0149] Las dosificaciones iniciales pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. Los modelos animales útiles para ensayar la eficacia de los compuestos para tratar CRC son muy conocidos en la técnica. Además, en los Ejemplos más adelante se describen modelos animales de CRC. Los expertos en la técnica pueden adaptar rutinariamente dicha información para determinar las dosificaciones adecuadas para la administración a seres humanos.

[0150] La dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante de la descripción puede variar de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 75 mg/kg por administración única (*por ejemplo*, bolo), múltiples administraciones o administración continua o para conseguir una concentración en suero de 0,01-5.000 µg/ml concentración en suero por administración única (por ejemplo, bolo), múltiples administraciones o administración continua o cualquier intervalo eficaz o valor en éste dependiendo de la afección que se está tratando, la ruta de administración y la edad, peso y condición del sujeto. En una determinada realización, cada dosis puede variar de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 50 µg por kilogramo de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 30 µg por kilogramo de peso corporal.

[0151] La cantidad, frecuencia y duración de la administración dependerán de una variedad de factores, tales como la edad, peso y afección patológica del paciente. Un régimen terapéutico para la administración puede continuar durante 2 semanas a indefinidamente, durante 2 semanas a 6 meses, de 3 meses a 5 años, de 6 meses a 1 ó 2 años, de 8 meses a 18 meses, o semejantes. Opcionalmente, el régimen terapéutico proporciona una administración repetida, *por ejemplo*, una vez al día, dos veces al día, cada dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas, o un mes. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. La administración puede repetirse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-hPG puede administrarse como una dosis única o durante el curso de un régimen terapéutico, *por ejemplo*, durante el

curso de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, tres meses, seis meses, un año o más.

Métodos terapéuticos

[0152] La capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes de la presente descripción para bloquear las respuestas dependientes de PG, incluyendo la proliferación celular, les hace útiles para tratar cáncer colorrectal. De acuerdo con esto, en otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para tratar CRC en un paciente que lo necesita. Generalmente, los métodos comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante de la descripción.

[0153] Un "sujeto" o "paciente" al que se administra un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción es preferiblemente un mamífero tal como un no primate (*por ejemplo*, vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata, *etc.*) o un primate (*por ejemplo*, mono o ser humano). El sujeto o paciente puede ser un ser humano, tal como un paciente adulto o un paciente pediátrico.

[0154] Los pacientes adecuados para la terapia con un anticuerpo monoclonal anti-hPG son pacientes diagnosticados con CRC. El CRC puede ser de cualquier tipo y estar en cualquier estadio o manifestación. Los sujetos adecuados incluyen pacientes con tumores de CRC (operables o inoperables), pacientes cuyos tumores se han eliminado o reseccionado quirúrgicamente, pacientes con un tumor de CRC que comprende células que portan una mutación en un oncogén, tal como, por ejemplo, RAS o APC, pacientes que han recibido otra terapia para CRC en combinación con o adyuvante a la terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG. Otra terapia para CRC incluye, pero no está limitada a, tratamiento quimioterapéutico, terapia de radiación, resección quirúrgica y tratamiento con uno o más antibióticos terapéuticos adicionales, como se detalla más adelante.

[0155] La terapia con anticuerpo anti-hPG puede combinarse con, o ser adyuvante de, uno o más tratamientos distintos. Otros tratamientos incluyen, sin limitación, tratamiento quimioterapéutico, terapia de radiación, resección quirúrgica y terapia con anticuerpo como se describe en la presente memoria.

[0156] La terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG puede ser adyuvante a otro tratamiento, incluyendo resección quirúrgica.

[0157] La terapia de combinación como se proporciona en la presente memoria implica la administración de al menos dos agentes a un paciente, el primero de los cuales es un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante de la descripción y el segundo de los cuales es un segundo agente terapéutico. El anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y el segundo agente terapéutico pueden administrarse simultáneamente, sucesivamente o separadamente.

[0158] Tal y como se usa en la presente memoria, el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y el segundo agente terapéutico se dice que se administran sucesivamente si se administran al paciente el mismo día, por ejemplo durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva puede ocurrir con una separación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas. Por el contrario, el anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción y el segundo agente terapéutico se dice que se administran separadamente si se administran al paciente en días diferentes, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción y el segundo agente terapéutico pueden administrarse en intervalos de 1 día, 2 días ó 3 días, una semana, 2 semanas o mensualmente. En los métodos de la presente descripción, la administración del anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción pede preceder o seguir a la administración del segundo agente terapéutico.

[0159] Como ejemplo no limitativo, el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante y el segundo agente terapéutico pueden administrarse simultáneamente durante un periodo de tiempo, seguido de un segundo periodo de tiempo en el que la administración del anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción y del segundo agente terapéutico se alterna.

[0160] Las terapias de combinación de la presente descripción pueden resultar en un efecto más que aditivo, o sinérgico, proporcionando beneficios terapéuticos en el que ni el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante ni el segundo agente terapéutico se administra en una cantidad que, sola, es terapéuticamente eficaz. Así, dichos agentes pueden administrarse en cantidades menores, reduciendo la posibilidad y/o gravedad de los efectos adversos.

[0161] Un segundo agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, moléculas radiactivas, toxinas, también referidas como citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluye cualquier agente que es perjudicial para la viabilidad de las células, agentes, y liposomas u otras vesículas que contienen compuestos quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen pero no están limitados a 1-dehidrotestosterona, 5-fluorouracil decarbazina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleuquina, agentes alquilantes, alopurinol sodio, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC)), agentes anti mitóticos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), diamino dicloro platino, antraciclinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG vivo (intravesical), fosfato de betametasona sodio y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfán, calcio leucouorina, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, Colchicina, estrógenos conjugados, Ciclofosfamida, Ciclotosfamida, Citarabina, Citarabina, citocalasina B, Citoxán, Dacarbazina, Dactinomicina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunirrubicina HCL, daunorrucbicina citrato, denileuquina diftitox, Dexrazoxano, Dibromomanitol, dihidroxi antracin diona, Docetaxel, dolasetron mesilato, doxorrubicina HCL, dronabinol, L-asparaginase de *E. coli*, emetina, epoetina-α, L-asparaginase de Erwinia, estrógenos esterificados, estradiol, fosfato de estramustina sodio, bromuro de etidio, etinil estradiol, etidronato, factor etopósido citrororum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, gemcitabina HCL, glucocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, granisetrón HCL, hidroxiurea, idarrubicina HCL, ifosfamida, interferón α-2b, irinotecán HCL, letrozol, leucovorina calcio, acetato de leuprolida, levamisol HCL, lidocaína, lomustina, maitansinoide, mecloretamine HCL, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalán HCL, mercaptipurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreótido, ondansetrona HCL, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato disodio, pentostatina, pilocarpina HCL, plimicina, polifeprosán 20 con implante de carmustina, porfimer sodio, procaína, procarbazina HCL, propranolol, rituximab, sargramostim, estreptozotocina,

tamoxifeno, taxol, tegafur, tenipósido, tenopósido, testolactona, tetracaína, tioepa clorambucilo, tioguanina, tiotepa, topotecán HCL, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina.

[0162] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes descritos en la presente memoria pueden administrarse a un paciente que necesita tratamiento para cáncer colorrectal recibiendo una combinación de agentes quimioterapéuticos. Las combinaciones ejemplares 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. El uso de otras combinaciones de agentes quimioterapéuticos descritos en la presente memoria también es posible.

[0163] Como se conoce en la técnica relevante, los regímenes de quimioterapia para cáncer colorrectal que usan combinaciones de diferentes agentes quimioterapéuticos se han estandarizado en ensayos clínicos. Dichos regímenes se conocen frecuentemente por acrónimos e incluyen 5FU Mayo, 5FU Roswell Park, LVFU2, FOLFOX, FOLFOX4, FOLFOX6, bFOL, FUFOX, FOLFIRI, IFL, XELOX, CAPOX, XELIRI, CAPIRI, FOLFOXIRI. *Véanse, por ejemplo,* Chau, I., *et al.*, 2009, Br. J. Cancer 100:1704-19 y Field, K., *et al.*, 2007, World J. Gastroenterol. 13:3806-15, ambos de los cuales se incorporan por referencia.

[0164] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG neutralizantes también pueden combinarse con otros anticuerpos terapéuticos. De acuerdo con esto, la terapia con anticuerpo monoclonal anti-hPG puede combinarse con, o administrarse como adyuvante con un anticuerpo monoclonal diferente tal como, por ejemplo, pero no como limitación, un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (receptor de EGF) o un anticuerpo monoclonal anti-VEGF. Los ejemplos específicos de anticuerpos anti-EGFR incluyen cetuximab y panitumumab. Un ejemplo específico de un anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab.

Detección de progastrina usando anticuerpos anti-hPG

[0165] Los anticuerpos monoclonales anti-PG, ya sean neutralizantes o no neutralizantes, también son útiles para aplicaciones que dependen de la detección de la PG tales como diagnóstico de CRC o monitorización del tratamiento en el CRC de un sujeto. De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar cáncer colorrectal en un paciente, que comprende determinar la cantidad de progastrina en una muestra del paciente usando un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la presente descripción. Generalmente, los métodos para diagnosticar cáncer colorrectal en un paciente comprenden medir la progastrina en una muestra obtenida de un paciente usando los anticuerpos monoclonales anti-hPG de la descripción, en el que la medida de 20 pM a 400 pM de progastrina en la muestra es indicativa de cáncer colorrectal. La progastrina puede medirse en muestras, *por ejemplo*, de sangre, suero, plasma, tejido y/o células. La detección de hPG puede realizarse usando ensayos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria, tales como, ELISA, ELISA sandwich, inmunotransferencia (transferencia Western), inmunoprecipitación, tecnología BIACORE y semejantes.

[0166] Como se indica en la presente memoria, la progastrina no es sino uno de varios polipéptidos diferentes que resultan del procesamiento posterior a la traducción del producto del gen de la gastrina. El diagnóstico, monitorización y otros métodos descritos en la presente memoria detectan específicamente hPG a diferencia de otros productos del gen de la gastrina, incluyendo productos de degradación. De acuerdo con esto, en realizaciones específicas, hPG se detecta usando un ELISA como se describe en la presente memoria, en el que se usan dos anticuerpos frente a hPG, dirigidos al extremo N y C terminal de hPG respectivamente. En algunas realizaciones, uno de los dos anticuerpos usados para la detección es un anticuerpo monoclonal anti-hPG como se describe en la presente memoria. Los niveles de hPG que van de 20 pM a 400 pM son indicativos de cáncer colorrectal.

[0167] En general, el procedimiento para determinar los niveles de hPG usando los anticuerpos monoclonales anti-hPG es como sigue. Se prepara una superficie, tal como los pocillos de una placa de 96 pocillos, a la que se une una cantidad conocida de un primer anticuerpo, "de captura", frente a hPG. El anticuerpo de captura puede ser, por

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

[0168] En una realización específica, los niveles de hPG se miden como sigue en una muestra de ensayo. Se recubren placas de 96 pocillos con entre 0,5 y 10 μg/mL de un anticuerpo policlonal anti-hPG C-terminal de conejo y se incuba toda la noche. Las placas se lavan tres veces en PBS-Tween (0,05%) y se bloquean con 2% (p/v) de leche seca desnatada en PBS-Tween (0,05%). Separadamente, las muestras de ensayo, muestras control (blanco o muestras de plasma o suero negativas para PG), y entre aproximadamente 5 pM ($0,5 \times 10^{-11}$ M) y aproximadamente 0,1 nM (1×10^{-10} M) de un estándar de referencia de hPG (hPG liofilizada diluida en plasma o suero negativo para PG) se preparan en un diluyente apropiado (por ejemplo, PBS-Tween 0,05%). Las muestras se incuban en las placas recubiertas durante entre 2 y 4 horas a 37°C, o alternativamente entre 12 y 16 horas a 21°C. Después de la incubación, las placas se lavan tres veces con PBS-Tween (0,05%) y se incuban con entre 0,001 y 0,1 μg/mL de un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal como se describe en la presente memoria, acoplado a peroxidasa de rábano (HRP)(Nakane *et al.*, 1974, J. Histochem. Cytochem. 22(12): 1084-1091) durante 30 minutos a 21°C. Las placas se lavan tres veces en PBS-Tween (0,05%) y se añade el sustrato de HRP durante 15 minutos a 21°C. La reacción se para añadiendo 100 μL de 0,5M ácido sulfúrico y se toma una medida de densidad óptica a 405 nm. Los niveles de hPG de la muestra de ensayo se determinan por comparación

con una curva estándar construida a partir de las medidas derivadas del estándar de referencia de hPG.

[0169] Típicamente, los pacientes se diagnostican tomando como base procedimientos invasivos tales como evaluación histológica de tejido de biopsia así como otros procedimientos invasivos tales como colonoscopia. CRC se divide en 5 estadios que van de Estadio 0 (cáncer limitado al recubrimiento más interno del colon o recto), Estadio 1 (cáncer en la pared interna del colon o recto), Estadio 2 (cáncer extendido a través de la pared del colon pero no encontrado en los ganglios linfáticos adyacentes), Estadio 3 (cáncer encontrado en los ganglios linfáticos y tejido que rodea al colon o recto), y Estadio 4 (el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo). Desde una perspectiva histológica, los tumores colorrectales presentan un amplio espectro de neoplasmas, que van de crecimientos benignos a cáncer invasivo y son predominantemente tumores derivados del epitelio (*es decir*, adenomas o adenocarcinomas). Las lesiones pueden clasificarse en tres grupos: pólipos no neoplásicos, pólipos neoplásicos (pólipos adenomatosos, adenomas), y cánceres. Los pólipos adenomatosos son tumores benignos que pueden sufrir transformación maligna y se han clasificado en tres tipos histológicos, con potencial maligno creciente: tubular, tubulovelloso y velloso. Los adenocarcinomas también se han categorizado según su histología en adenocarcinoma mucinoso (coloide); adenocarcinoma en anillo de sello; tumores escirro; y neuroendocrino.

[0170] A diferencia de los medios actuales para diagnosticar CRC, la presente descripción proporciona métodos para diagnosticar a sujetos con CRC en ausencia de ningún análisis histológico o estadio de la enfermedad, tomando como base la medida de los niveles de hPG que pueden determinarse a partir de una muestra de sangre. Además, los métodos de la presente descripción son útiles para seleccionar pacientes con CRC adecuados para terapia monoclonal anti-hPG independientemente de cómo se ha diagnosticado a un paciente.

[0171] Los niveles séricos de PG también son útiles para evaluar la eficacia del tratamiento de CRC. De acuerdo con esto, la presente descripción proporciona un método para monitorizar la eficacia de la terapia de cáncer colorrectal que comprende determinar los niveles de PG en un paciente que se está tratando para CRC. Los métodos para

monitorizar la eficacia de la terapia de cáncer colorrectal comprenden determinar repetidamente los niveles de hPG usando un anticuerpo monoclonal anti-PG de la presente descripción en un paciente con cáncer colorrectal que se está sometiendo a tratamiento para cáncer colorrectal, en el que una disminución en los niveles circulantes de hPG del paciente durante un intervalo de tratamiento es indicativa de la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, puede tomarse una primera medida de los niveles circulantes de hPG de un paciente seguido de una segunda medida mientras o después de que el paciente recibe tratamiento para cáncer colorrectal. Las dos medidas se comparan y una disminución en los niveles de hPG es indicativa de beneficio terapéutico.

[0172] En un aspecto, la descripción proporciona kits de diagnóstico que contienen los anticuerpos monoclonales anti-hPG (incluyendo conjugados de anticuerpo). El kit de diagnóstico es un envase que comprende al menos un anticuerpo monoclonal anti-hPG de la descripción (*por ejemplo*, bien en forma liofilizada o como una disolución acuosa) y uno o más reactivos útiles para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico (por ejemplo, diluyentes, un anticuerpo marcado que se une a un anticuerpo monoclonal anti-hPG, un sustrato apropiado para el anticuerpo marcado, hPG en una forma apropiada para usarse como un control positivo y estándar de referencia, un control negativo). En realizaciones específicas, un kit comprende dos anticuerpos anti-hPG, en el que al menos uno de los anticuerpos es un anticuerpo monoclonal anti-hPG. Opcionalmente, el segundo anticuerpo es un anticuerpo policlonal anti-hPG. En algunas realizaciones, el kit de la presente descripción comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal como se describe en la presente memoria.

[0173] Los anticuerpos anti-hPG pueden estar marcados, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, el kit puede incluir un anticuerpo marcado que se une a un anticuerpo monoclonal anti-hPG y se conjuga con una enzima. Cuando el anticuerpo monoclonal anti-hPG u otro anticuerpo se conjuga con una enzima para detección, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por la enzima (*por ejemplo*, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos, tales como estabilizadores, tampones (*por ejemplo*, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y semejantes. Los anticuerpos monoclonales anti-hPG incluidos en un kit de diagnóstico pueden inmovilizarse en una superficie sólida o,

alternativamente, una superficie sólida (*por ejemplo*, un portaobjetos) en la que puede inmovilizarse el anticuerpo se incluye en el kit. Las cantidades relativas de los diferentes reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los anticuerpos y los demás reactivos pueden proporcionarse (individualmente o combinados) como polvos secos, habitualmente liofilizados, que incluyen excipientes que, en disolución, proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

[0174] Los kits pueden incluir materiales de instrucción que contienen instrucciones (*por ejemplo*, protocolos) para la práctica de los métodos de diagnóstico. Aunque los materiales de instrucción comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no están limitados a éstos. Esta invención contempla un medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas al usuario final. Dichos medios incluyen, pero no están limitados a, medios de almacenamiento electrónico (*por ejemplo*, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (*por ejemplo*, CD ROM), y semejantes. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de internet que proporcionan dichos materiales de instrucción.

EJEMPLOS

[0175] Los ejemplos siguientes son ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales frente a progastrina

Inmunógenos para progastrina humana

[0176] Se generaron varios inmunógenos para desarrollar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales frente a la progastrina humana. Los antígenos usados previamente para generar anticuerpos policlonales, tales como progastrina humana de longitud completa e inmunógenos basados en los residuos 70 a 80 de hPG, no dieron lugar a una respuesta inmune monoclonal ni dieron lugar a anticuerpos monoclonales específicos de PG. Como se describe con más detalle más adelante, los antígenos de 14 aminoácidos y más largos, que incluían secuencias únicas de hPG en el extremo N-terminal y C-terminal de la proteína, fueron capaces de inducir una respuesta inmune adecuada en animales y se usaron para generar hibridomas que producen más de 20

anticuerpos monoclonales diferentes frente a hPG. Sorprendentemente, varios inmunógenos que incluían los residuos 55 a 80 de hPG, algunos de los cuales también se encuentran en otros péptidos derivados del gen de la gastrina, se usaron con éxito para generar anticuerpos monoclonales que eran específicos para hPG. La tabla siguiente resume los inmunógenos ensayados.

Tabla 2

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

* Los ratones inmunizados no presentaron ninguna respuesta inmune.

[0177] Los inmunógenos listados en la Tabla 2 se prepararon según las técnicas conocidas en la técnica, usando síntesis química de la secuencia peptídica y el conector, seguido de entrecruzamiento con el vehículo Albúmina de Suero Bovino (BSA), Hemocianina de Lapa (KLH), o Toxina de la Difteria (DT) usando un agente de entrecruzamiento apropiado (por ejemplo, MBS (éster de m-Maleimidobenzoil-N-hidrosuccinimida), glutaraldehído o Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato). (Coligan JE et al., Current protocols in Immunology, Vol. 2, Nueva York: John Wiley and Sons; 1996, p 9.0.1-9.0.15; Harlow DL. Antibodies: A Laboratory Manual. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998, p72-87). Los conectores usados fueron uno o dos residuos de ácido aminohexanoico (Ahx) acoplados a un residuo de cisteína.

[0178] En cada uno de tres experimentos, se inyectaron a los ratones Balb/c 4 a 5 veces inmunógenos N-terminales, y 2 a 4 veces inmunógenos C-terminales. Cada inyección administró 10 μg del inmunógeno con Ribi, Alun o de adyuvante de Freund.

Fusiones Celulares y cribado de hibridomas

[0179] El suero de cada ratón se ensayó por ELISA frente al inmunógeno y se recogieron los esplenocitos de los ratones con la respuesta inmune más fuerte. Los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma Sp2 usando polietilen glicol y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 15.000 a 35.000 células por pocillo. Las células fusionadas se seleccionaron, usando un medio que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT).

[0180] Los sobrenadantes de los hibridomas se cribaron por ELISA para la capacidad de unirse al inmunógeno y a la progastrina de longitud completa. Se realizaron tres ciclos de cribado para asegurar que sólo se seleccionaron los hibridomas que producen de manera estable anticuerpos que reconocen hPG de longitud completa y el inmunógeno.

[0181] El cribado de los hibridomas y anticuerpos monoclonales para determinar la unión a diferentes péptidos PG se realizó usando una técnica ELISA como se describe más adelante. Este protocolo se usó para cribar para unión a PG de los esplenocitos fusionados, subclones del primer y segundo ciclo, así como para verificar la especificidad de los anticuerpos frente a PG, comparado con otros péptidos derivados del gen de la gastrina.

[0182] Brevemente, se incubaron placas de 96 pocillos toda la noche a 4°C con la concentración o concentraciones apropiadas de un péptido de ensayo en Disolución Salina Tamponada con Fosfato (PBS), después de lo cual los pocillos se lavaron tres veces con disolución de lavado (PBS y 0,1% Tween-20), y se incubaron durante 2 horas a 22°C con 100 μL de disolución de bloqueo (PBS, 0,1% Tween-20, 0,1% Albúmina de Suero Bovino o hidrolizado de caseína) por pocillo. Después del bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces y se añadió el anticuerpo primario – el anticuerpo que se va a ensayar–. Para el cribado inicial de los esplenocitos fusionados, se añadieron 50 μL del sobrenadante de cultivo de cada cultivo que se va a ensayar a cada pocillo de la placa. En los ensayos realizados en anticuerpos monoclonales, se añadieron 100 μL del anticuerpo

de ensayo en PBS y 0,1% Tween-20 a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 22°C, después de lo cual la disolución de anticuerpo primario se desechó y se reemplazó, después de una etapa de lavado (3X 100 µL de disolución de lavado, como se ha indicado anteriormente), por disolución de bloqueo que contiene el anticuerpo secundario, que se une al anticuerpo primario y está acoplado a una enzima. El anticuerpo secundario fue un anticuerpo IgG (Fc) anti-ratón de cabra acoplado a peroxidasa de rábano. Después de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario, se añadieron 100 µL de disolución de sustrato (*por ejemplo*, Fast OPD, o dihidrocloruro de *O*-Fenilendiamina, disponible en Sigma-Aldrich Co., preparado según las direcciones del fabricante) a cada pocillo y se incubó en oscuridad durante 20 minutos a 22°C. La reacción se paró añadiendo 50 µL de 4N ácido sulfúrico y se determinó la cantidad de sustrato catalizado midiendo la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. La conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario (de ensayo) unido al antígeno. Los experimentos se hicieron en duplicado y las medidas de DO se representaron como una función de la concentración de antígeno o anticuerpo dependiendo del objetivo del experimento. Las muestras se clasificaron como positivas para anticuerpos anti-PG si la D.O. medida estaba entre 0,2 y 1,5. El mismo intervalo de D.O. se usó para identificar los anticuerpos que se unieron al péptido inmunogénico usado para inocular a los animales de ensayo.

[0183] Los materiales y reactivos ejemplares usados en el ensayo son los siguientes:

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

[0184] Los péptidos ejemplares usados en el cribado de hibridomas y anticuerpos monoclonales fueron los siguientes:

38

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

La progastrina humana recombinante se produjo como se describe en McQueen et al, 2002, J. Protein Chem. 21: 465-471) con pequeñas modificaciones. Brevemente, células bacterianas BL21 DE3 Star (InVitrogen) se transformaron con un vector que contiene la secuencia de la progastrina humana de longitud completa en un núcleo PGEX-GST-TEV (GE Healthcare). Las bacterias se crecieron en medio LB que contiene 0,5 mM IPTG durante 3 horas a 37°C. Los sedimentos bacterianos se rompieron usando una Prensa French, y las fracciones tanto solubles como no solubles se separaron por centrifugación. Posteriormente, se aisló hPG etiquetada con GST usando una columna de afinidad de glutatión y PG se escindió de GST con la proteasa del Virus del Mosaico del Tabaco NIa (TEV). Finalmente, PG se dializó frente al tampón final (10mM Hepes, 0,5 % BSA, pH 7,4).

[0185] Los hibridomas se clonaron en primer lugar, después se subclonaron y se amplificaron. Los hibridomas positivos se seleccionaron tomando como base los criterios siguientes: (1) especificidad de PG e inmunógeno, (2) afinidad relativa de los anticuerpos, (3) crecimiento de las células del hibridoma, (4) secreción de anticuerpos, y (5) monoclonalidad de los hibridomas. Los ensayos y los criterios de selección fueron como sigue.

[0186] Para especificidad, los sobrenadantes de los hibridomas de ensayo se ensayaron por ELISA como se ha descrito anteriormente (50 µL de una dilución 1 en 2 del sobrenadante en el medio de ensayo PBS). Los hibridomas se clasificaron como positivos si la medida de D.O. estaba ente 0,2 y 1,5 en un ensayo con hPG o el inmunógeno usado para inocular los ratones de ensayo. Como criterio adicional para la especificidad, los clones se seleccionaron tomando como base la ausencia de unión a otros péptidos derivados del gen de la gastrina. La ausencia de unión se midió como una diferencia no

estadísticamente significativamente diferente entre la señal de los pocillos de ensayo y la señal media de los pocillos control que contienen sólo PBS.

[0187] Para la caracterización de la afinidad, se ensayaron diluciones seriadas de los anticuerpos por ELISA para unión a hPG, como se ha descrito anteriormente. Las diluciones estándar usadas en los ensayos de los anticuerpos N-terminales fueron 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 ng/ml. Las diluciones estándar usadas en ensayos de anticuerpos C-terminales fueron 0, 0,03, 0,1, 0.3, 1, 3, 10, 30 ng/ml.

[0188] El crecimiento de las células de hibridoma a través de múltiples ciclos de cultivo seriado se evaluó por observación microscópica dos días después de la siembra. Se espera que las células proliferen y llenen el pocillo unas 48 horas después de la siembra. Se realizó la dilución seriada (típicamente, una primera dilución a 1:5, seguido de al menos 2 diluciones más a 1:10), seguido de observación microscópica a las 48 horas para confirmar un crecimiento adecuado. Las células de los hibridomas que cumplen este criterio se diluyeron y sembraron de nuevo, para observarse con el microcopio 48 horas más tarde. Dichos ciclos de "dilución-siembra-observación" se repitieron 3 veces antes de que clasificar un hibridoma como que cumple los criterios de "crecimiento".

[0189] La secreción de anticuerpos se ensayó realizando ELISA usando hPG como se ha descrito anteriormente en diluciones seriadas (1/2, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1.000, 1/2.000) de los sobrenadantes sin células.

[0190] La monoclonalidad se determinó sembrando un clon o hibridoma en una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,6 células/pocillo e incubando durante dos semanas. A las dos semanas, los sobrenadantes se ensayaron para unión a hPG por ELISA y la naturaleza clonal de la población se determinó tomando como base el tener un valor DO consistente en al menos el 90% de los pocillos que contienen células vivas.

Anticuerpos monoclonales frente a progastrina de longitud completa

[0191] Cada uno de tres ratones se inoculó con progastrina humana recombinante (descrito anteriormente). El inmunógeno no indujo ninguna respuesta inmune detectable en los ratones: no pudo detectarse ninguna unión a PG usando un ELISA como se ha descrito anteriormente. No se realizaron fusiones.

Anticuerpos monoclonales N-terminales frente a la progastrina

[0192] Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos monoclonales N-terminales se generaron frente a un antígeno que contiene los residuos 1 a 14 de hPG unido a albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa (KLH) mediante un conector Ahx-Cys en el extremo C-terminal del antígeno de 14 residuos (SWKPRSQQPDAPLG-Ahx-Cys (SEQ ID NO:26)).

[0193] En un primer experimento, tres ratones se inocularon con un péptido N-terminal unido a BSA. De tres fusiones, realizadas con esplenocitos de dos de los tres ratones, una fusión no rindió clones que mostraran unión a PG o al inmunógeno. De las otras dos fusiones sembradas en placas de 96 pocillos, una generó 4 hibridomas que se unen a PG y específicos de PG, de los cuales se recuperó un único subclón estable que produce IgG. La segunda fusión también resultó en un subclón de hibridoma único estable que produce IgG1, unión a PG y específico para PG. Globalmente, de los tres ratones, 17 hibridomas en el primer ciclo, ó 0,74% de los hibridomas cribados) fueron positivos para unión a PG e inmunógeno, de los cuales se subclonaron 9 líneas celulares positivas, de las cuales dos fueron líneas celulares positivas, que producen IgG. Así, el primer experimento generó dos clones después de un par de ciclos de subclonación que retuvieron una señal positiva fuerte frente al inmunógeno y hPG (positivo para "unión a PG") y no se unieron a otros péptidos derivados del gen de la gastrina (positivo para "específico para PG"): los hibridomas 43B9G11 y WE5H2G7, que producen anti-hPG MAb1 y anti-hPG MAb 2□ respectivamente.

[0194] En un segundo experimento, los ratones se inocularon con un péptido N-terminal unido a KLH. Se realizaron dos fusiones con células de mieloma Sp2. De éstas, sólo una fusión generó clones positivos para PG e inmunógeno, que también fueron específicos para PG. De ésta, se sembraron 1.920 hibridomas. Muchos hibridomas fueron positivos

en el ensayo con los péptidos inmunizantes pero no progastrina, o no fueron específicos para PG. Específicamente, 297 hibridomas mostraron una señal positiva fuerte para el péptido inmunizante (aproximadamente 15,5% de 1.920), de los cuales 124 también fueron positivos para unión a progastrina (6,5%). Hubo 36 hibridomas, ó 1,8%, que fueron positivos para progastrina pero no el inmunógeno usado. Sólo 12 hibridomas de los 1.920 sembrados rindieron anticuerpos que se unen específicamente a progastrina pero no a otros productos del gen de la gastrina (0,6% del total de hibridomas, 3,6% de los clones que fueron positivos para el péptido y/o progastrina en el primer cribado). De los 12 clones seleccionados, sólo 2 fueron lo suficientemente estables como para establecerse como clones permanentes y congelarse durante un almacenamiento a largo plazo. Así, en este segundo experimento, de los casi 2.000 hibridomas que se sembraron, sólo se recuperaron 2 clones, 6B5B11C10 (que produce anti-hPG MAb 3) y 20D2C3G2 (que produce anti-hPG MAb4), que producen anti-hPG MAb3 y MAb4 respectivamente, que expresan anticuerpos monoclonales capaces de unirse a hPG y al péptido inmunizante y que tienen especificidad para la progastrina sobre otros productos del gen de la gastrina y alta afinidad para hPG. Ambos anticuerpos ejemplares son del isotipo IgG1.

[0195] En un tercer experimento, los ratones se inocularon con el mismo inmunógeno que en el segundo experimento. Las fusiones con células de mieloma Sp2 se realizaron con esplenocitos de dos ratones con la respuesta inmune más fuerte. Los hibridomas se sembraron a partir de las fusiones (3.840 hibridomas de una fusión cada uno, por ratón) y los sobrenadantes se ensayaron para unión a PG e inmunógeno, así como especificidad para PG. De cada fusión, 6 hibridomas mostraron especificidad para PG, de los cuales se seleccionaron 3 subclones que cumplían la selección adicional para crecimiento, monoclonalidad, secreción de anticuerpos, afinidad relativa. Así, en total, 2,9% de los hibridomas ensayados después de sembrar (220/7.680) fueron positivos para PG e inmunógeno, de los cuales 0,15% fueron clones positivos (12/7.680), constituyendo los subclones finales recuperados 0,15% de los hibridomas originales sembrados (6/7.680). Este experimento generó los hibridomas 1E9A4A4 (que producen anti-hPG MAb 15), 1E9D9B6 (que producen anti-hPG MAb 16), 1C8D10F5 (que producen anti-hPG MAb

17), 1A7C3F11 (que producen anti-hPG MAb 18), 1B3B4F11 (que producen anti-hPG MAb 19), y 1C11F5E8 (que producen anti-hPG MAb 20).

[0196] La tabla siguiente muestra el número de clones sembrados para cada experimento, el inmunógeno usado y el número y porcentaje de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que reconocieron tanto el inmunógeno como la progastrina de longitud completa.

Tabla 3

Expt	Inmunógeno	Clones sembrados	Sobrenadantes de hibridoma PG^+	Clones específicos de PG	Subclones específicos para PG, que producen IgG
1	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-BSA	2.304	17 (0,74%)	9 (0,39%)	2 (0,087%)
2	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	1.920	124 (6,5%)	12 (0,6%)	2 (0,1%)
3	(SEQ ID NO:26)-Ahx-Cys-KLH	7.680	220 (2,9%)	12 (0,15%)	6 (0,1%)

Anticuerpos monoclonales C-terminales frente a progastrina

[0197] Se generaron anticuerpos monoclonales C-terminales frente a un antígeno que contiene los residuos 55 a 80 de hPG unidos bien a KLH o a DT mediante un conector Cys-Ahx-Ahx en el extremo N-terminal del antígeno de 26 residuos (Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEQ ID NO:96)). Los intentos de generar hibridomas con un antígeno más pequeño que sólo contiene los residuos 70 a 80 de hPG, Cys-Ahx-Ahx-FGRRSAEDEN (SEQ ID NO:97), conjugado bien con BSA o KLH, fracasaron en la generación de clones.

[0198] Se realizaron tres experimentos. En los dos primeros experimentos, en los que se usó el péptido más corto, se recuperaron cero subclones. Específicamente, en un primer experimento se inyectó a 4 ratones un péptido C-terminal correspondiente a SEQ ID NO:97, unido a BSA. Ninguna de las fusiones generó ningún hibridoma que produce

IgG. En un segundo experimento, se inyectó a 6 ratones, 3 a cada uno, un péptido correspondiente a SEQ ID NO:97, unido a KLH en su extremo N-terminal, o un péptido correspondiente a SEQ ID NO:97, unido a KLH en su extremo C-terminal. Para el primer inmunógeno, se realizaron fusiones y se recuperaron los hibridomas, pero no se aislaron subclones positivos para unión a PG y especificidad para PG. Para el segundo inmunógeno, ninguno de los ratones desarrolló una respuesta inmune y no se realizaron fusiones.

[0199] En un tercer experimento, se usó un péptido de 26 aminoácidos que incluye las secuencias C-terminales no únicas de hPG. El inmunógeno, que incluía un péptido correspondiente a SEQ ID NO:96 unido a KLH o DT, se inyectó a los ratones. Las fusiones con células de mieloma Sp2 se realizaron con esplenocitos de los dos ratones que tuvieron la respuesta más fuerte. Se sembraron 3.840 hibridomas a partir de una fusión por ratón. Globalmente, de los 7.680 hibridomas cribados, de los cuales 382 (5%) fueron positivos para PG y específicos para PG, se recuperaron 13 (0,17%) subclones estables, positivos: 1B4A11D11 (que produce anti-hPG MAb 5), 1B6A11F2 (que produce anti-hPG MAb 6), 1B11E4B11 (que produce anti-hPG MAb 7), 1C10D3B9 (que produce anti-hPG MAb 8), D8F5B3 (que produce anti-hPG MAb 9), 1E1C7B4 (que produce anti-hPG MAb 10), 2B4C8C8 (que produce anti-hPG MAb 11), 2B11E6G4 (que produce anti-hPG MAb 12), 2C6C3C7 (que produce anti-hPG MAb 13), 2H9F4B7 (que produce anti-hPG MAb 14), 1F11F5E10 (que produce anti-hPG MAb 21), 1F11F5G9 (que produce anti-hPG MAb 22), y 1A11F2C9 (que produce anti-hPG MAb 23).

[0200] La tabla siguiente muestra el número de clones sembrados para cada experimento, el inmunógeno usado, el número de hibridomas cribado, el número y porcentaje de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que se unen a PG y el inmunógeno, que son específicos para PG y que cumplen los criterios de selección (crecimiento, monoclonalidad, afinidad relativa, etc.) después de tres ciclos de subclonación.

41

Tabla 4					
Expt	**Inmunógeno**	**Clones sembrados**	**Sobrenadantes de hibridoma PG^+**	**Clones específicos para PG**	**Subclones específicos para PG, que producen IgG**
1	BSA-conector-(SEQ ID NO:97)	3.072	10 (0,32%)	9 (0,29%)	0
2	KLH- conector-(SEQ ID NO:97)	1.920	27 (0,47%)	4 (0,07%)	0
	(SEQ ID NO:97)- conector-KLH		0	0	0
3	KLH-conector-(SEQ ID NO:96)	3.840	192 (5%)	17 (0,44%)	10 (0,26%)
	DT-conector-(SEQ ID NO:96)	3.840	190 (4,95%)	13 (0,34%)	3 (0,08%)

[0201] Los anticuerpos monoclonales y los hibridomas estables a partir de los que se producen se detallan en la tabla siguiente:

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

[0202] Las líneas celulares de hibridoma 1B4A11D11 (MAb 5, no. de registro CNCM I-4371), 1B6A11F2 (MAb 6, no. de registro CNCM I-4372), 1B11E4B11 (MAb 7, no. de registro CNCM I-4373), 2B4C8C8 (MAb 11, no. de registro CNCM I-4374), 2B11E6G4 (MAb 12, no. de registro CNCM I-4375), y 1E9A4A4 (MAb 15, no. de registro y NCM I-4376) se depositaron según el Tratado de Budapest y se recibieron el 6 de octubre, 2010 por la Collection Nationale de Cultures de Microorganisms (CNCM), Instituto Pasteur, París, Francia.

Clonación y secuenciación de los anticuerpos monoclonales anti-hPG

[0203] Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas pueden clonarse y secuenciarse usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de los hibridomas listados en la Tabla 5 anterior se secuenciaron como se describe más adelante.

[0204] Las secuencias que codifican los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 6B5B11C10 y 20D2C3G2 se clonaron y secuenciaron usando técnicas estándar. Brevemente, se aisló el ARN total a partir de sedimentos celulares congelados usando reactivo RNABee, AMSBio no. de catálogo CS-104B, usado según las instrucciones del fabricante. El ADNc para las regiones V se preparó a partir de ARNm usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), seguido de una amplificación rápida 5' de los extremos del ADNc (RACE). La síntesis de ADNc se realizó usando cebadores específicos de la región constante, después de lo cual el producto de la primera cadena se purificó y se usó desoxinucleótido transferasa terminal para añadir colas homopoliméricas a los extremos 3' del ADNc. Las secuencias de ADNc "con cola" se amplificaron por PCR usando parejas de cebadores, cada uno de los cebadores para la cola homopolimérica y bien la región V_H o V_L, respectivamente. Los productos de PCR de la región variable de cadena pesada y ligera se clonaron en un vector de clonación "TA" (p-GEM-T easy, Promega no. de cat. A 1360) y se secuenciaron usando procedimientos estándar. *Véase* la FIG. 2A-B (MAb 3), FIG. 2C-D (MAb 4).

[0205] Las secuencias que codifican los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas 1C10D3B9, 2C6C3C7, 1B3B4F1, y 1E9D9B61 se determinaron como sigue.

42

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

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

A. Afinidad Relativa

[0206] La afinidad relativa de los anticuerpos monoclonales ejemplares se midió usando el método ELISA descrito anteriormente, en el que los pocillos se recubrieron con una disolución de péptido que contiene 50ng de progastrina y se incubó en presencia de concentraciones crecientes de cada anticuerpo monoclonal como sigue:

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

[0207] La FIG 3A muestra la afinidad relativa de cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG, MAbs 1-4 ensayados a concentraciones de 1 ng/mL a 1 µg/mL. La FIG 3B muestra

la afinidad relativa de los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales MAbs 3 y 15-20 ensayados a concentraciones de anticuerpo de 0,1-100 ng/mL. La FIG 3C muestra la afinidad relativa de los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales MAbs 5-14 y 21-23 ensayados a concentraciones de anticuerpo de 0,03-30 ng/mL.

B. Medidas de la constante de afinidad

[0208] Para proporcionar una cuantificación más absoluta de la afinidad para los anticuerpos monoclonales, las constantes de afinidad se midieron usando la Técnica Proteon (BioRad), según Nahshol *et al.*, 2008, Analytical Biochemistry 383:52-60, incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad. Brevemente, un anticuerpo IgG anti-ratón (50 μg/ml) se utilizó para recubrir un chip sensor en primer lugar, asegurando que la señal detectada por el chip después de la inyección del anticuerpo está entre 10.000 y 11.500 RU (unidades de respuesta). El anticuerpo monoclonal murino que se va a ensayar se inyectó (concentraciones típicas: 30 μg/ml). La unión suficiente del anticuerpo que se va a ensayar se determinó tomando como base una señal adicional de al menos 500 RU en el chip sensor. Se midió un curso de tiempo de la interacción entre los anticuerpos monoclonales anti-progastrina y la progastrina inyectando varias concentraciones de progastrina, por ejemplo 200, 100, 50, 25, y 12,5 nM, y se detectó el nivel de asociación. Típicamente, están disponibles varios canales para ensayar múltiples anticuerpos en paralelo en un único experimento, haciendo posible ensayar la unión de los anticuerpos de ensayo a varias concentraciones de PG en paralelo. Típicamente, un canal se reserva para un anticuerpo monoclonal murino que no es específico para PG, como un control para unión no específica, y en otro canal se inyecta tampón de dilución solo como una línea base para la señal de fondo. Generalmente, no es detectable ninguna unión en los canales en los que se ha inyectado anticuerpo murino no específico. Los anticuerpos que presentan un alto nivel de asociación en este entorno, que puede resultar en la saturación del anticuerpo monoclonal atrapado por progastrina, puede ensayarse frente a concentraciones menores de progastrina (50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 nM), lo que permite una medida más refinada.

[0209] Las constantes de afinidad (KD) se calcularon como la relación entre la constante de disociación (kd) y la constante de asociación (ka). Los valores experimentales se

43

validaron analizando la similitud estadísticamente relevante entre las curvas experimentales tomando como base las medidas de unión y los perfiles teóricos. El modelo matemático usado en los experimentos Proteon para seleccionar si las curvas experimentales se ajustan al modelo teórico fue el modelo de Langmuir, basado en una interacción 1:1 entre las moléculas de progastrina y los anticuerpos monoclonales anti-progastrina.

Tabla 6

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

Ejemplo 3: Agregación de anticuerpos anti-hPG

[0210] La agregación de los anticuerpos puede reducir la eficacia terapéutica reduciendo la cantidad de anticuerpo disponible para unirse a la proteína diana. Los anticuerpos con niveles muy bajos de agregación son preferibles para aplicaciones terapéuticas. Cada lote de anticuerpo variará comparado con otros lotes del mismo anticuerpo monoclonal. Generalmente, es deseable usar lotes con agregación baja. Para cuantificar la agregación del anticuerpo, se pusieron disoluciones de anticuerpo en un espectrofluorímetro (Photon Technology International), y se irradiaron a 280nm. La difusión se midió a 280nm, mientras que la emisión debida a los aminoácidos aromáticos (principalmente triptófanos) se midió a 330nm. El nivel de agregación se cuantificó calculando la relación entre los valores de medida de DO a 280nm frente a 330nm, como se describe en *Nominé et al.*, 2003, Biochemistry 42: 4909-4917. Una relación 280/330nm alta indica una mayor cantidad de agregación. La concentración de anticuerpo usada fue 15 μg/ml, 5 a 15 veces por encima de la usada para los tratamientos *in vitro*.

[0211] Los resultados se muestran en la Tabla 7 siguiente y en la FIG.4.

Tabla 7

Muestra	Relación 280/330 nm
Albúmina de Suero Bovino (n=1)	6,4
Anti-hPG MAb 1 (n=1)	15,42
Anti-hPG MAb 2 (n=2)	9,81
Anti-hPG MAb 3 (n=2)	3,08
Anti-hPG MAb 4 (n=2)	1,94

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

[0212] PG es sólo uno de los productos peptídicos del gen de la gastrina. Otros productos del gen de la gastrina tienen funciones en la homeostasis normal, pero es la función de PG en CRC lo que la hace una diana útil para propósitos terapéuticos y de diagnóstico. Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria son específicos para la progastrina de longitud completa por encima de todos los demás péptidos que resultan de la expresión y procesamiento del gen de la gastrina, tales como gastrinas extendidas con glicina (G17-gly), amidadas (Gastrina17) y el péptido flanqueante C-terminal (CTFP).

Estos péptidos están presentes en la circulación. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-hPG se determinó ensayando los anticuerpos frente a la progastrina humana y otros péptidos derivados del gen de la gastrina, usando el ensayo ELISA descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

[0213] Específicamente, se recubrieron pocillos con una disolución que contiene uno de los péptidos siguientes a las cantidades indicadas: progastrina, hemocianina de lapa (KLH), gastrina-17 amidada (G17), gastrina 17 extendida con glicina (Ggly), o Péptido Flanqueante C-terminal (CTFP):

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

[0214] En un primer experimento, se usaron 3 ng/ml (0,3 ng) de anti-hPG MAb 3 y 1 μg/ml (0,1 μg) de cada uno de los anti-hPG MAbs 1, 2, y 4. *Véase* la FIG 5A. En un segundo experimento, se ensayó la especificidad de unión de los anti-hPG MAbs 5 a 14 y 21-23 a 0,3 ng/mL, véase la FIG 5B, y la especificidad de unión de los anti-hPG MAbs 3, 15-20 se ensayó a 1 ng/mL, véase la FIG 5C.

[0215] Los anticuerpos presentaron una reacción débil a cantidades elevadas de KLH que estaba acoplada al péptido antigénico usado en algunos de los inmunógenos para inmunizar los ratones en el Ejemplo 1 anterior. No hubo un efecto detectable de BSA en la unión a PG de ningún anticuerpo, incluyendo los generados frente a inmunógenos que incluían BSA como vehículo.

[0216] Todos los anticuerpos presentaron una alta especificidad para la unión a hPG de longitud completa (ensayado a 50 y después a 25 ng) comparado con otros péptidos derivados del gen de la gastrina, tales como gastrina-17 amidada, gastrina 17 extendida con glicina y el péptido flanqueante C-terminal, un péptido de 5 aminoácidos que se escinde de la progastrina durante el procesamiento normal del polipéptido para formar gastrina. Los anticuerpos ejemplares no mostraron una unión detectable (señal por

encima del fondo de "PBS solo") frente a ninguno de los péptidos derivados del gen de la gastrina aparte de hPG.

Ejemplo 5: Ensayo de Competición

[0217] La capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG para competir con un anticuerpo policlonal anti-hPG para unirse a la progastrina se determinó usando un ELISA con un anticuerpo anti-hPG "de captura" y un anticuerpo anti-hPG "de detección". Anti-hPG MAb 3 se ensayó como sigue: se pre-recubrieron placas de 96 pocillos con anticuerpos policlonales progastrina C-terminales generados frente a un péptido que consiste en los residuos 71 a 80 de hPG. Las placas se incubaron con 100pM progastrina, seguido de la adición de 10μg/ml de anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal biotinilado, generado frente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25, y concentraciones crecientes de anticuerpo monoclonal anti-hPG MAb 3. La unión del anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal biotinilado se detectó incubando las placas con estreptavidina-HRP seguido de OPD, según protocolos estándar. La unión se midió cuantificando la luminiscencia.

[0218] Los resultados muestran que concentraciones crecientes (μg/ml) de Anti-hPG MAb 3 disminuyen la capacidad de anticuerpos policlonales anti-hPG de unirse a la progastrina, mostrando que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo policlonal. *Véase,* la FIG. 6.

Ejemplo 6: Mapeo de epítopos

[0219] Los epítopos específicos unidos por los anticuerpos monoclonales ejemplares se mapearon usando la técnica SPOT y escaneo de alanina, como se describe en Laune, D., et al., 2002, *J. Immunol. Methods* 267:53-70 y Laune, D., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:30937-30944, respectivamente. En la técnica SPOT, se generan 15 secuencias peptídicas de 15 aminoácidos que engloban un epítopo putativo y se distribuyen en una membrana de nitrocelulosa que se ensaya con el anticuerpo de ensayo para determinar la mínima secuencia de epítopo reconocida por el anticuerpo. El escaneo de alanina se usa para determinar los residuos en un epítopo que son críticos para la unión del anticuerpo:

cada residuo en un epítopo putativo se muta uno a uno a una alanina, y los péptidos que contiene alanina se ensayan con el anticuerpo de ensayo.

[0220] Se identificaron familias de epítopos para anticuerpos ejemplares de la presente descripción. Para los anticuerpo monoclonales N-terminales frente a hPG MAbs 1-4 y 15-20, los epítopos comprenden al menos las secuencias siguientes: DAPLG (SEQ ID NO:28), PDAPLG (SEQ ID NO:29), PRSQQPD (SEQ ID NO:30), WKPRSQQPD (SEQ ID NO:31), o WKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO:32), como se muestra en la Tabla 8 siguiente.

Tabla 8

MAb	Antígeno peptídico PG: **SWKPRSQQPDAPLG**	**SEQ ID NO**
MAb 2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 1	PDAPLG	29
MAb 3	DAPLG	28
MAb 17	WKPRSQQPD	31
MAb 18	WKPRSQQPD	31
MAb 19	WKPRSQQPD	31
MAb 20	WKPRSQQPD	31
MAb 15	PRSQQPD	30
MAb 16	PRSQQPD	30

[0221] Para los anticuerpos monoclonales C-terminales frente a hPG MAbs 5-7, 9-12, 14 y 21-23, los epítopos comprenden al menos las secuencias siguientes: FGRR (SEQ ID NO:33), MDFGR (SEQ ID NO:34), AEDEN (SEQ ID NO:35), y GWMDFGRR (SEQ ID NO:36), como se muestra en la Tabla 9 siguiente.

Tabla 9

MAb	Antígeno peptídico PG: **QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN**	**SEQ ID NO**
MAb 14	GWMDFGRR	36
MAb 11	MDFGR	34
MAb 5	FGRR	33
MAb 6	FGRR	33
MAb 7	FGRR	33
MAb 9	FGRR	33
MAb 10	FGRR..E	33
MAb 12	FGRR	33
MAb 23	AEDEN	35

Ejemplo 7: Actividad neutralizante de los anticuerpos anti-hPG en líneas celulares de cáncer

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

[0222] Los anticuerpos monoclonales anti-hPG disminuyen la supervivencia celular en líneas celulares de cáncer colorrectal representativas. Las líneas celulares de cáncer colorrectal adecuadas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, HCT116, LS174T, SW480, y SW620 son líneas celulares que se usan comúnmente para estudiar cáncer de colon, que producen y secretan progastrina. Los anticuerpos monoclonales frente a PG se ensayaron para su capacidad para inhibir la proliferación en estas diferentes líneas celulares. La supervivencia de las células de cada una de HCT116, LST174T, SW480, y SW620 se ensayó usando diferentes anticuerpos monoclonales anti-hPG.

[0223] Para cada experimento, se sembraron 50.000 células en placas de 6 pocillos en medio que contiene suero fetal de ternera y se incubaron durante 8 horas. Se quitó el suero a las células toda la noche y empezando 24 horas después de la siembra (tiempo "T0"), las células se trataron en duplicado cada 12h durante 48 horas, en ausencia de suero fetal de ternera, con 1 μg/ml de anticuerpos monoclonales control (anti-IgG1 humana de ratón, Calbiochem, Ref #411451)(CT mAb), o con 1 μg/ml de anti-hPG MAb 1-4 como se indica. Después de la cuantificación adicional de los anticuerpos monoclonales, se determinó que los anticuerpos se habían usado a aproximadamente 3 a 5 μg/ml. Se contó el número de células a T0 en un pocillo control, para cada experimento. Para las células HCT116, los experimentos se realizaron en presencia de 0,5% de suero fetal de ternera. 48h después del inicio del experimento, se contó el número de células supervivientes en cada pocillo tres veces en un experimento ciego. La reducción en la proliferación o supervivencia de células de CRC se determinó calculando las células supervivientes tratadas con anti-hPG MAB como porcentaje de las células tratadas con MAb control. Los recuentos celulares al inicio del tratamiento (T0) se restaron de los recuentos celulares de ensayo y control medidos a las 48 horas. Específicamente, el número de células vivas tanto en los pocillos control como tratados con anti-hPG MAb se contó a las 48 horas, después se calculó la diferencia entre cada

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

[0224] Las FIG. 7A-C muestran el efecto de anti-hPG MAb 3 y anti-hPG MAb 4 en la supervivencia de las células SW480, células LS174T, y células HCT116 a partir de experimentos representativos. Los resultados son la media +/- S.E. de 4 pocillos de dos experimentos independientes. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo significativamente el número de células comparado con el tratamiento con el anticuerpo control. La significancia estadística se determinó usando un Ensayo de la T de Student: * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, y *** = $p<0,001$. En cada línea celular, los anticuerpos anti-hPG redujeron la supervivencia celular. En una línea celular, LST174T, los números de células al final de las 48 horas de tratamiento con anticuerpos anti-hPG fueron menores que los números de células al inicio del experimento, lo que sugiere que los anticuerpos producen la muerte celular, además de inhibir la proliferación celular.

[0225] La Tabla 10 muestra el porcentaje de células de cáncer colorrectal SW480 supervivientes tratadas con cada uno de cuatro anticuerpos monoclonales anti-hPG comparado con un anticuerpo monoclonal control (anti-IgG1 humana de ratón, Calbiochem, Ref #411451)(CT mAb).

Tabla 10

SW480 (T0 = 26 667)	**Número de células– T0**	**% del control**	**p (Tratado frente a Control) Mann Whitney, dos colas**
mAb Control	36.050 +/- 3.228		
Anti-hPG MAb 1	30.425 +/- 3.098	84,4	0,3556
Anti-hPG MAb 2	28.925 +/- 2.757	80,2	0,0476
Anti-hPG MAb 3	6.050 +/- 1.788	16,8	< 0,0001
Anti-hPG MAb 4	17.560 +/- 3.439	48,7	0,0002

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

[0226] Las tablas siguientes muestran el porcentaje de células LS174T y HCT-116 supervivientes tratadas con anti-hPG MAb 3 y 4 comparado con el anticuerpo

monoclonal control. Los datos se representan gráficamente en los paneles correspondientes de la FIG 7.

Tabla 11

HCT-116 (T0 = 42.750)	Número de células– T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
MAb Control	151.250 +/- 9.071		
MAb3	62.750 +/- 9.194	41,5 %	< 0,0001
MAb4	82.250 +/-7.435	54,4 %	<0,0001

Tabla 12

LS 174T (T0 = 51.666)	Número de células– T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
MAb Control	85.334 +/- 7.520		
MAb3	-6.666 +/- 5.000	- 8 %	0,0084
MAb4	+8.334 +/- 2.500	7 %	0,0085

[0227] Bajo condiciones de ensayo *in vitro*, no se espera la inhibición completa del crecimiento celular. En cultivo celular, la progastrina es secretada continuamente por las células de cáncer y se acumula en el medio del cultivo celular. Se espera que los niveles de progastrina se incrementen en el tiempo más de lo que ocurriría en la circulación en el cuerpo, incrementando la relación de proteína diana a anticuerpo y diluyendo el efecto neutralizante de los anticuerpos. Así, se espera que el efecto neutralizante observado con los anticuerpos *in vitro* sea más fuerte *in vivo*, cuando la progastrina secretada por las células de tumor sea transportada por la corriente sanguínea, disminuyendo su acumulación *in situ*.

[0228] La inhibición de la proliferación celular por los anti-hPG MAbs 5 a 23 se determinó en una o más de las líneas celulares de CRC SW620, HCT116, y LS47T. Los ensayos se realizaron en placas de 6 pocillos como se ha descrito anteriormente usando 5 µg/ml de anticuerpos monoclonales control o de ensayo (anti-hPG). Se sembraron 50.000 células por pocillo para las células HCT116 y LS174T, y 100.000 para las células SW620. Las tablas siguientes proporcionan el porcentaje de células tratadas

supervivientes respecto al tratamiento control de experimentos representativos. Los resultados medios se representan en las FIG.s 7G-I para las líneas celulares SW620, LS174T, y HCT-116 respectivamente.

Tabla 13

	Número de células– T0	**% del control**	**P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas**
Experimento 1			
SW 620 (T0 = 103.067)			
MAb Control	82.100 +/- 15.489	-	
MAb 5	54.511 +/-8.292	66 %	< 0,0001
MAb 6	44.367 +/- 9.321	54 %	< 0,0001
MAb 7	49.279 +/- 8.009	60 %	< 0,0001
MAb 8	32.673 +/- 4.680	40 %	< 0,0001
MAb 9	73.283 +/- 3.835	89%	0,1305
MAb 10	70.178 +/- 4.173	85 %	0,0618
Experimento 2			
SW 620 (T0 = 118.553)			
MAb Control	81.347 +/-6.062		
MAb 11	46.974 +/-7.422	58 %	0,0003
MAb 12	52.980 +/- 10.529	65 %	0,0002
MAb 13	38.933 +/- 5.284	48 %	0,0003
MAb 14	83.767 +/- 9.484	103 %	0,21
MAb 21	59.497 +/- 2.828	73 %	0,0002
MAb 22	64.227 +/- 7.123	79 %	0,0013
MAb 23	83.914 +/- 5.629	103 %	0,82
Experimento 3			
SW 620 (T0 = 116.283)			
MAb Control	101.333 +/- 17.626	-	
MAb 15	66.052 +/-7.739	65 %	< 0,0001
MAb 16	58.883 +/- 9.950	58 %	< 0,0001
MAb 17	76.688 +/- 5.578	75,5 %	0,0014
MAb 18	75.874 +/- 10.129	75 %	0,0005
MAb 19	70.242 +/- 10.851	69 %	< 0,0001
MAb 20	66.470 +/- 7.557	66 %	< 0,0001

Tabla 14

	Número de células– T0	**% del control**	**P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas**
Experimento 1			
LS 174T (T0 = 60.944)			
MAb Control	107.956 +/- 5.859		
MAb 13	62.341 +/- 10.683	58 %	0,0003

Tabla 14

	Número de células– T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
MAb 16	65.389 +/- 8.185	61 %	0,0002
Experimento 2			
LS 174T (T0 = 86.389)			
Mab Control	241.711 +/- 11.620		
MAb 14	246.444 +/- 19.563	102 %	ns
MAb 19	204.433 +/- 8.946	84,5 %	0,0005
Experimento 3			
LS 174T (T0 = 79.667)			
MAb Control	135 800 +/- 18.338		
MAb 8	57 333 +/- 12.657	42 %	< 0,001

Tabla 15

	Número de células– T0	% del control	P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas
Experimento 1			
HCT-116 (T0 = 49.286)			
MAb Control	78.214 +/- 6.230		
MAb 13	28.805 +/- 3.477	36 %	< 0,0001
MAb 16	56484 +/- 8.333	72 %	< 0,0001
MAb 19	68.945 +/- 8.795	88 %	0,0302
Experimento 2			
HCT-116 (T0 = 60.944)			
MAb Control	122.456 + / - 1.697		
MAb 8	75.867 + /- 15.627	62 %	< 0,0001
MAb 16	87.011 +/- 5.091	71 %	< 0,0001

(B) Actividad neutralizante de anticuerpos policlonales anti-hPG

[0229] Los ensayos se realizaron como se ha descrito anteriormente, con las modificaciones siguientes. Se usó un anticuerpo policlonal anti-hPG N-terminal como se ha descrito en el Ejemplo 5. Como control, se usaron 3 µg/ml de policlonal (Policlonal anti-IgG humana de Conejo, Affinity BioReagents, Ref #SA1-600)(CT pAB). Para los tratamientos anti-PG, se usaron 3 µg/ml de anticuerpos policlonales anti-hPG para todas las líneas celulares. SW480 y LS174T se trataron con anticuerpos policlonales anti-hPG

48

control o N-terminales durante 24 a 48h en DMEM sin FCS, mientras que HCT116 se trataron con anticuerpos policlonales anti-hPG durante 48h en DMEM con 0,5% FCS. Las células supervivientes se tripsinizaron y contaron, en comparación con células tratadas con una concentración equivalente de anticuerpo policlonal control (anti IgG humana).

[0230] Los resultados de experimentos representativos se muestran en las tablas siguientes y en la FIG. 7D-F. El tratamiento con anticuerpos policlonales anti-hPG redujo significativamente el número de células comparado con el tratamiento con anticuerpo control. La significancia estadística se determinó usando un ensayo de la T de Student: * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, y *** = $p<0,001$. Los números de células se expresan respecto al número de células en cultivo al inicio del experimento (T0). Para cada experimento, las células en cada uno de 4 pocillos se contaron tres veces. Como con los anticuerpos monoclonales anti-hPG, la proliferación de las células de cáncer colorrectal se inhibe por los anticuerpos policlonales anti-hPG, demostrando que los efectos anti-tumorales observados con los anticuerpos policlonales frente a progastrina son predictivos de manera razonable de la actividad de los anticuerpos monoclonales en el bloqueo del efecto de la progastrina en células de cáncer.

Tabla 16

	Número de células– T0	**% del control**	**P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas**
Experimento 1			
SW 480 (T0 = 26.667)			
PAb Control	37.580 +/- 4233		
PG PAb	7.833 +/- 3660	21 %	0,0001
Experimento 2			
HCT-116 (T0 = 58.750)			
PAb Control	105.350 +/- 8660		
PG PAb	7.833 +/- 3660	21 %	< 0,05
Experimento 3			
LS174T (T0 = 112.500)	**Número de células– T0**	**% del control**	**P (Tratado frente a Control) Mann Whitney, Dos colas**
PAb Control	207.500 +/- 10.000		
PG PAb	102.500 +/- 5.000	49,5 %	< 0,01

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

[0231] Para demostrar que el efecto neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG está mediado por la unión a hPG, las células LS174T se cultivaron en presencia de un anticuerpo ejemplar – anti-hPG MAb 8 – que se había pre-incubado con y sin hPG. Como controles positivo y negativo, las células se cultivaron con hPG sola, un anticuerpo control solo, y el anticuerpo control pre-incubado con hPG.

[0232] Específicamente, se pre-incubó 33,3 nM (5μg/mL) anti-hPG MAb 8 durante 1 hora a temperatura ambiente con un exceso molar de 20 veces de hPG recombinante, ó 667 nM (6,67 μg/mL). Se usó progastrina humana recombinante, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1. En paralelo, se pre-incubó de manera similar 33,3 nM (5μg/mL) de anti-IgG1 humana murina (General BioScience, no. de referencia AB23420) con y sin hPG.

[0233] Se sembraron 5.000 células LS174T en cada pocillo de placas de 96 pocillos en medio que contiene 10% Suero Fetal de Ternera y se incubaron durante 8 horas, después de lo cual las células se cambiaron a medio sin suero y se crecieron durante 12 horas más. Después de crecer en medio sin suero durante 12 horas, las células se trataron con uno de los siguientes cada 12 horas: anticuerpo control, anticuerpo control pre-incubado con hPG, anti-hPG MAb 8 solo, anti-hPG MAb 8 pre-incubado con hPG, y hPG sola. 48 horas después del primer tratamiento, se cuantificaron las células viables remanentes incubando las placas con Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution y registrando la absorbancia a 490 nM. La absorbancia medida para las células tratadas con el anticuerpo monoclonal control ("MAb control") se ajustó a 100%, y las demás condiciones experimentales se midieron frente a la absorbancia de las células tratadas con el MAb control. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente y en la FIG. 8.

Tabla 17

	Absorbancia	**% del control**	**p (Tratado frente a Control) Mann Whitney, dos colas**
Tratamiento con PG solo	0,244 +/- 0,088	132,5%	0,099 (n.s.)

49

Tabla 17

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

[0234] La adición de, o la incubación de los anticuerpos con, hPG incrementa el número de células vivas en cultivo. Por el contrario, el tratamiento de las células con anti-hPG MAb 8 solo causa una reducción significativa en el número de células viables. Así, la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-hPG para neutralizar la actividad de PG se suprime por la adición de hPG, que se piensa que se une a y satura el anticuerpo. Este resultado confirma la especificidad de la actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-hPG.

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

[0235] Se han desarrollado varios modelos experimentales *in vivo* para el estudio de cáncer colorrectal. Se han desarrollado estudios con xenoinjerto en ratón, en los que tejido o células tumorales de líneas celulares de cáncer humano se trasplantan en un ratón inmunodeficiente (denominado "desnudo"). Pocard M., *et al.*, *In vivo* (1996) 10(5): 463-469. También se han desarrollado varios modelos de ratón transgénico. Los modelos murinos incluyen mutaciones heterocigóticas en el gen de poliposis adenomatosa cólica (APC), tal como Apc^{Min}, *Apc1638N*, *Apc716*, o *ApcΔ14*. El gen supresor de tumores APC codifica una proteína citosólica, APC, que, cuando está intacta, se une a y secuestra β-catenina en el citosol en un complejo multi-proteico que dirige la β-catenina al proteasoma para degradación, evitando de esta manera que β-catenina active el factor de transcripción Tcf-4 en el núcleo. Heyer *et al.*, Oncogene 18:5325-5333 (1999). Los ratones APCΔ14 portan una deleción heterocigótica del exón 14 en el gen de *poliposis adenomatosa cólica* (APC). De manera similar a lo que ocurre en más del 70% de los pacientes con cáncer colorrectal esporádico, la pérdida somática de heterocigosidad

(LOH) en el segundo alelo *Apc* ocurre en las células intestinales, lo que da lugar a una activación constitutiva del complejo transcripcional β-catenina/Tcf-4 y al desarrollo espontáneo de tumores intestinales en estos animales. El origen molecular de estos adenomas y carcinomas, así como la morfología tumoral (incluyendo la vascularización, respuesta inflamatoria y presencia de células inmunes) con una gran similitud con la de los tumores humanos comparado con los modelos de xenoinjerto en ratón, hace de APCΔ14 un modelo altamente relevante para los estudios de terapia de cáncer colorrectal humano. Colnot *et al.*, 2004, Lab. Invest. 84:1619-1630. Otros modelos de ratón transgénico se basan en mutaciones en genes tales como MSH2, MSH6, CDX2, K-RAS, así como líneas que combinan mutaciones en APC con mutaciones en otros oncogenes. Heyer *et al.*, 1999, Oncogene 18:5325-5333, Janssen KP *et al.*, 2002, Gastroenterology 123: 492-504. Estos modelos se usan ampliamente para estudiar el cáncer colorrectal y para ensayar hipótesis respecto al tratamiento del cáncer colorrectal.

[0236] Los ratones transgénicos que portan una deleción heterocigótica del exón 14 con el gen de *poliposis adenomatosa cólica* (APCΔ14) sirven como modelo para cáncer colorrectal, desarrollando tumores similares a los encontrados en cánceres de colon humanos. En un primer experimento, se trataron ratones APCΔ14 con una preparación que contiene cantidades iguales de anticuerpos policlonales anti-hPG generados frente a (1) un péptido correspondiente a SEQ ID NO:25 y (2) un péptido C-terminal como se describe en Hollande et al., WO 07/135542. Se trataron ratones de 3,5 meses de edad durante 5 semanas con anticuerpo policlonal control o anticuerpo policlonal anti-hPG (dos ratones por tratamiento). Los anticuerpos se administraron por inyección intra-peritoneal dos veces a la semana a una dosis de 10 mg/kg (150 µl volumen de inyección). Al final del tratamiento, los ratones se sacrificaron y los intestinos se lavaron con PBS, se diseccionaron para formación de imágenes digital y se fijaron en 4% para-formaldehído para análisis inmuno-histoquímico. Se registró el número de tumores y las imágenes de tejido colorrectal.

[0237] La evaluación morfológica del tejido intestinal mostró que los anticuerpos anti-hPG no afectaban la renovación del epitelio intestinal murino sano. Se contaron los tumores en los grupos de tratamiento y control. El número total de tumores para los

50

ratones tratados con anticuerpos control fue 27, comparado con 4 en los ratones tratados con anticuerpos anti-hPG. Así, los anticuerpos anti-hPG reducen el recuento de tumores más de 6,5 veces comparado con los anticuerpos control mientras que no afectan la renovación del epitelio sano en el intestino del ratón.

[0238] En un segundo experimento, se examinó el efecto de los anticuerpos anti-hPG en ratones APCΔ14 y ratones normales (control) (C57BL6J). Se trataron ratones de 4 meses de edad dos veces a la semana durante 6 semanas con anticuerpo policlonal control –un antisuero anti-IgG humana de conejo (Jackson ImmunoResearch (no. de referencia 309-005-0089)– o anticuerpo policlonal anti-hPG, por inyección intra-peritoneal dos veces a la semana a una dosis de 9 mg/kg (150 µl volumen de inyección). Después de seis semanas de tratamiento, dos horas antes del sacrificio, se inyectó a los ratones Bromo-desoxi-uridina (BrdU)(2 mg por ratón, inyección intraperitoneal). 6 ratones APCΔ14 se trataron con policlonal anti-hPG y 4 con anticuerpos policlonales control. Los anticuerpos control y anti-hPG se administraron a 6 ratones normales (C57BL6J) cada uno. No se detectaron anormalidades intestinales en ninguno de los ratones de ningún grupo, lo que demuestra adicionalmente la seguridad y ausencia de efectos adversos de los anticuerpos anti-hPG en tejido intestinal normal.

[0239] El número y tamaño de los tumores (altura y longitud) se examinaron en los grupos tratados frente a control de ratones APCΔ14. El tamaño de los tumores se determinó por medidas de las imágenes tomadas de los intestinos de cada animal, preparado como sigue. Los intestinos se lavaron como se ha descrito anteriormente, se diseccionaron longitudinalmente, se incluyeron en parafina y se procesaron para inmuno-histoquímica usando la técnica "Swiss roll". Las medidas de la longitud y altura tumorales se realizaron usando el programa informático Image J.

[0240] Los resultados se muestras en la Tabla 18 y en la FIG. 8A y B. Los resultados del tamaño tumoral muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tratados control y tratados con anti-hPG. La significancia estadística se determinó usando un ensayo de Mann Whitney: * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, y *** = $p<0,001$. Los ratones tratados con el anticuerpo control presentaron un total de 125 tumores, con 31,25 tumores de media por ratón. Los ratones tratados con anti-hPG presentaron 46 tumores o una

media de 7,6 tumores por ratón. Esta diferencia es estadísticamente significativa (ensayo de Mann-Whitney, P= 0,0095) mostrando que los anticuerpos anti-hPG reducen significativamente el número de tumores de cáncer colorrectal *in vivo*.

Tabla 18

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

[0241] Los anticuerpos anti-hPG reducen significativamente los tumores de cáncer colorrectal *in vivo* según se mide por la reducción tanto en el número de tumores como en el tamaño de los tumores en un modelo murino de cáncer colorrectal, sin ningún efecto adverso aparente en el epitelio colorrectal normal. Así, el tratamiento de tumores de cáncer colorrectal con anti-hPG proporciona un beneficio terapéutico *in vivo*.

Ejemplo 10: Diseño de anticuerpos anti-hPG humanizados

[0242] Se diseñaron anticuerpos humanizados "in silico" a partir de los anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos MAbs 3, 4, 8, 13, 16, y 19. El diseño de los anticuerpos humanizados se realizó según la metodología descrita en Lefranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77; Lefranc et al., 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111. Para cada uno de los anticuerpos monoclonales murinos, las a las secuencias peptídicas de V_H y V_L humanizadas correspondientes se determinaron: identificando las regiones CDR y marco de las secuencias murinas usando la base de datos IMGT-ONTOLOGY (Duroux et al., 2008, Biochimie, 90:570-583; Giudicelli y Lefranc, 1999, Bioinformatics, 15: 1047-1054) y las bases de datos y herramientas IMGT® (Ehrenmann et al., 2010, Nucl.Acids. Res., 38: D301-307; Brochet et al., 2008, Nucl.Acids. Res., 36: W503-508) seguido de la identificación de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de la región marco humanas más próximas en IMGT/GENE-DB (Giudicelli et al., 2005, Nucl.Acids. Res., 33: D256-261), e injertando las secuencias CDR murinas en las regiones marco humanas. Más particularmente, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los dominios V_H y

V_L murinos se analizaron usando IMGT/V-QUEST e IMGT/ DomainGapAlign para delimitar las regiones CDR y marco murinas, definir las longitudes de CDR e identificar los aminoácidos de anclaje. Los aminoácidos de anclaje son los residuos en la posición 26, 39, 55, 66, 104 y 118 de IMGT "Collier de Perles" que apoyan CDR1-IMGT, CDR2-IMGT, CDR3-IMGT (Kaas y Lefranc, 2007, Current Bioinformatics, 2: 21-30; Kaas et al., Brief. Funct. Genomic Proteomic, 2007, 6: 253-264). Se identificaron los genes V (variable) y J (de unión) humanos más próximos a las secuencias murinas y se eligieron los genes más adecuados. Los aminoácidos individuales en la región marco murina se mantuvieron si se consideró que posiblemente contribuían a la especificidad del anticuerpo en comparación con estructuras 3D conocidas (Kaas et al., 2004, Nucl. Acids. Res. 32: 208-210) usando IMGT Collier de Perles en dos capas.

[0243] Se determinó que las CDR de V_H para MAb 3 tenían una longitud de 8, 8, y 8 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 3 V_H murina, IGHV1-5*01, se diferenciaba en 10 residuos, 3 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados (I29 en CDR1, F56 y S65 en CDR2). Además, se consideró que V39, G55, y R66 eran potencialmente importantes para mantener la especificidad y se mantuvieron en el diseño. El gen de la línea germinal humano más próximo fue IGHV1-3*01 (63,3% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 27 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la Treonina-123 y la Leucina-124 por Leucina-123 y Valina-124, para equiparar con el gen IGHJ1*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 3 es 87,8% idéntica a la región variable para IGHV1-46*03 y 88 de los 91 aminoácidos en las cuatro regiones marco son idénticos.

[0244] Se determinó que las CDR de V_L para MAb 3 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 3 V_L murina, IGKV1-117*01, se diferenciaba en un único residuo mapeado en una región marco. El gen de la línea germinal humana más próximo fue IGKV2-30*02 (81% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 14 diferencias en la secuencia en las regiones

marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. Los residuos E40 y F68 se han mantenido en la secuencia humanizada proyectada. En la región marco 4, se cambió la Leucina-124 por Valina-124, para equiparar con el gen IGKJ4*01 humano. Globalmente, la secuencia Vκ humanizada para MAb 3 es 93% idéntica a IGKV2D-29*02 y 87 de los 89 aminoácidos en las cuatro regiones marco son idénticos.

[0245] Las secuencias de V_H y Vκ proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 19

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
21	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWVHWVRQAP GQRLEWMGGFYPGNSDSRYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCTRRDSPQYWGQGTLVTVSS	hV_H3
22	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQ QRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIK	hVκ3

[0246] Se determinó que las CDR de V_H para MAb 4 tenían una longitud de 8, 8, y 11 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 4 V_H murina, IGHV1-9*01, se diferenciaba en 11 residuos, 4 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados (S35, S36, y S37 en CDR1, F56 en CDR2). Además, se consideró que D66 era potencialmente importante para mantener la especificidad y se mantuvo en el diseño. El gen de la línea germinal humana más próximo fue IGHV1-46*03 (64,9% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 27 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Alanina-128 por Serina-128, para equiparar con el gen IGHJ5*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 4 es 91,8% idéntica a la región variable para IGHV1-46*03 y 90 de los 91 aminoácidos en las cuatro regiones marco son idénticos.

[0247] Se determinó que las CDR de V_L para MAb 4 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 4 V_L murina, IGKV1-110*01, se diferenciaba en 3 residuos, 2 de los cuales se mapearon en CDR1 (Serina-34 y Valina-36) y se mantuvieron

52

en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. El gen de la línea germinal humana más próximo fue IGKV2D-29*02 (81% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 11 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Serina-120 por Glutamina-120, para equiparar con el gen IGKJ2*01 humano. Globalmente, la secuencia Vκ humanizada para MAb 4 es 92% idéntica a IGKV2D-29*02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0248] Las secuencias de V_H y Vκ proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 20

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
23	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSSWMHWVRQAPG QGLEWMGIFLPGSGSTDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCATDGNYDWFAYWGQGTLVTVSS	hV_H4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHSSGVTYLYWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK	hVκ4

[0249] Se determinó que las CDR de V_H para MAb 8 tenían una longitud de 8, 8, y 10 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb8 V_H murina, IGHV5-9-3*01, se diferenciaba en 5 residuos, 4 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la línea germinal humana más próximos fueron IGHV3-21*01 y *02 (80,4% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 12 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la Serina-123 y la Leucina-124 por Treonina-123 y Valina-124, respectivamente, para equiparar con el gen IGHJ6*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 8 es 92,8% idéntica a la región variable para IGHV3-21*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco. Existe un sitio potencial de N-glicosilación en la V_H CDR3 murina para MAb8.

[0250] Se determinó que las CDR de V_L para MAb 8 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón

más próximo a la secuencia de MAb 8 V_L murina, IGKV2-109*01, se diferenciaba en 6 residuos, 4 de los cuales se mapearon en CDR1 y se mantuvieron en el diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la línea germinal humana más próximos fueron IGKV2-28*01 y IGKV2D-28*01 (75% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 12 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la Alanina-120, Leucina-124, y Leucina 126 por Glicina-120, Valina-124, e Isoleucina-126, respectivamente, para equiparar con el gen IGKJ4*01 humano. Globalmente, la secuencia Vκ humanizada para MAb 8 es 87% idéntica a IGKV2-28*01 y IGKV2D-28*01 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0251] Las secuencias de V_H y Vκ proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 21

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
75	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FTTYAMNWVRQAPGKGLEWVSSISSGGT YTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTT VTVSS	hV_H8a
76	DIVMTQSPLSLPVTPGEPA SISCRSSKSLRHTKGITFLD WYLQKPGQSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	hVκ8a
77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVS SISSGGTYTYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV_H8b
78	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSKSLRHTKGITFLYWYLQKPG QSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPLTFGGGTKVEIK	hVκ8b
79	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG GTYTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTTVTVSS	hV_H8b

[0252] Se determinó que las CDR de V_H para MAb 13 tenían una longitud de 8, 8, y 7 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 13 V_H murina, IGHV5-6-3*01, se diferenciaba en 10

residuos, 5 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en la diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la línea germinal humana más próximos fueron IGHV3-7*01 y *02 (78,6% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 13 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambiaron la Treonina-123 y la Leucina-124 por Leucina-123 y Valina-124, respectivamente, para equiparar con el gen IGHJ4*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 13 es 91,8% idéntica a la región variable para IGHV3-7*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0253] Se determinó que las CDR de V_L para MAb 13 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 13 V_L murina, IGKV1-135*01, se diferenciaba en un único residuo localizado en una región marco. Los genes de la línea germinal humana más próximos fueron IGKV2-30*01 y *02 (81% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 13 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Leucina-124 por Valina-124, para equiparar con el gen IGKJ4*01 humano. Globalmente, la secuencia de Vκ humanizada para MAb 13 es 94% idéntica a IGKV2-30*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0254] Las secuencias de V_H y Vκ proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 22

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYGMSWVRQAP GKGLEWVANINTFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGTLVTVSS	hV_H.13a
81	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK	hVκ13a
82	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYGMSWVRQ APGKGLEWVASINTFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGTYWGQGTLVTVSS	hV_H13b
83	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNW FQQRPGQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK	hVκ13b

[0255] Se determinó que las CDR de V_H para MAb 16 tenían una longitud de 8, 8, y 10 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 16, V_H murina, IGHV1-53*01, se diferenciaba en 7 residuos, 2 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en la diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. Los genes de la línea germinal humana más próximos fueron IGHV1-46*01 y *03 (71,4% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 25 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Leucina-124 por Valina-124, para equiparar con el gen IGHJ6*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 16 es 96,9% idéntica a la región variable para IGHV1-46*01 y *03 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0256] Se determinó que las CDR de V_L para MAb 16 tenían una longitud de 11, 3, y 9 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 16, V_L murina, IGKV1-135*01, se diferenciaba en 4 residuos localizados en una región marco. Los genes de la línea germinal humana más próximos fueron IGKV2-30*01 y *02 (79% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign), que se diferenciaban en un aminoácido en CDR1. Se encontraron 15 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Glicina-120 por Glutamina-120, para equiparar el gen IGKJ2*01 humano. Globalmente, la secuencia de Vκ humanizada para MAb 16 es 94% idéntica a IGKV2-30*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0257] Las secuencias de V_H y Vκ proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 23

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
84	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPG QGLEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSS LRSEDTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTTVTVSS	hV_H16a
85	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHSPYTFGQGTKLEIK	hVκ16a
86	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQG LEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTTVTVSS	hV_H16b

Tabla 23

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
87	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGKTYLYWFQQRP GQSPRRLIYLVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHSPYTFGQGTKLEIK	hVκ16b
88	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGL EWMGEINPSNGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRGGYYPFDYWGQGTTVTVSS	hV_H16c
89	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGKTYLYWFQQRP GQSPRRLIYLVSERDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHSPYTFGQGTKLEIK	hVκ16c

[0258] Se determinó que las CDR de V_H para MAb 19 tenían una longitud de 9, 7, y 14 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 19 V_H murina, IGHV3-2*01, se diferenciaba en 5 residuos, 2 de los cuales se mapearon en las CDR y se mantuvieron en la diseño de los anticuerpos monoclonales anti-hPG humanizados. El gen de la línea germinal humana más próximo fue IGHV4-30-4*01 (72,4% idéntico a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Sin embargo, como este gen es polimórfico, se seleccionaron IGHV4-31*02 y *03 (71,4% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 21 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Isoleucina-123 por Leucina-123, para equiparar con el gen IGHJ4*01 humano. Globalmente, la V_H humanizada para MAb 19 es 91,9% idéntica a la región variable para IGHV4-31*02 y *03 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0259] Se determinó que las CDR de V_L para MAb 19 tenían una longitud de 7, 7, y 13 aminoácidos para CDR 1, 2, y 3 respectivamente. El gen de la línea germinal de ratón más próximo a la secuencia de MAb 19 V_L murina, IGLV3*01, se diferenciaba en 8 residuos, 5 de los cuales se localizaron en una CDR. Los genes de la línea germinal humana más próximos fueron IGLV4-69*01 y *02 (69,9% idénticos a nivel de aminoácidos tomando como base IGMT/DomainGapAlign). Se encontraron 23 diferencias en la secuencia en las regiones marco 1 a 3 entre los genes de la línea germinal murina y humana. En la región marco 4, se cambió la Valina-124 por Leucina-124, para equiparar con el gen IGLJ3*01 humano. Alternativamente, el gen IGJK4*01

puede usarse para la región marco 4. Globalmente, la secuencia de Vκ humanizada para MAb 19 es 92,4% idéntica para IGLV4-69*01 y *02 y 100% idéntica para las cuatro regiones marco.

[0260] Las secuencias de V_H y Vκ proyectadas se proporcionan en la tabla siguiente.

Tabla 24

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos	Cadena V
90	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWSWIRQH PGKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLVTVSS	V_H19a
91	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRTYTIAWHQQQPEK GPRYLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSE DEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	Vκ19a
92	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLT**C**TVSGYSITSDYAWNWIRQHP GKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYY**C**AREVNYGDSYHFDYWGQGTLVTVSS	V_H19b
93	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRTYTIEWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSED EADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	Vκ19b
94	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWIRQHPGK GLEWIGYISFSGYTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLVTVSS	V_H19c
95	QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHRTYTIEWHQQQPEKGP RYLMEVKKDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDE ADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	Vκ19c

[0261] Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente y otros documentos citados en esta solicitud se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad para todos los propósitos en la misma magnitud que si se indicara individualmente que cada publicación, patente, solicitud de patente u otro documento individual se incorpora por referencia para todos los propósitos. Aunque se han ilustrado y descrito varias realizaciones específicas, se apreciará que pueden hacerse varios cambios sin apartarse del espíritu y alcance de la o las invenciones.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la progastrina humana (hPG).

2. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 1** que se une específicamente a una región N-terminal de hPG.

3. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que se puede obtener usando un inmunógeno que comprende un antígeno peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:25.

4. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que compite para la unión a hPG con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, y 1C11F5E8.

5. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que comprende las CDR de V_L y V_H correspondientes en secuencias a las CDR de V_L y V_H de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, y 1C11F5E8.

6. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que comprende las CDR de V_L y V_H que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de CDR de V_L y V_H:

(i) V_H CDR1.3, V_H CDR 2.3, V_H CDR 3.3, V_L CDR 1.3, V_L CDR 2.3, y V_L CDR 3.3;

(ii) V_H CDR 1.4, V_H CDR 2.4, V_H CDR 3.4, V_L CDR 1.4, V_L CDR 2.4, y V_L CDR 3.4;

(iii) V_H CDR 1.16, V_H CDR 2.16, V_H CDR 3.16, V_L CDR 1.16, V_L CDR 2.16, y, V_L CDR 3.16; y

(iv) V_H CDR 1.19, V_H CDR 2.19, V_H CDR 3.19, V_L CDR 1.19, V_L CDR 2.19, y V_L CDR 3.19.

7. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-6**, que es humanizado.

8. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 7** que comprende cadenas V_H y V_L que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de V_H y V_L:

(i) hV_H 3 (SEQ ID NO:21) y hV_L 3 (SEQ ID NO:22);

(ii) hV_H 4 (SEQ ID NO:23) y hV_L 4 (SEQ ID NO:24);

(iii) hV_H 16a (SEQ ID NO:84) y hV_L 16a (SEQ ID NO:85);

(iv) hV_H 16b (SEQ ID NO:86) y hV_L 16b (SEQ ID NO:87);

(v) hV_H 16c (SEQ ID NO:88) y hV_L 16c (SEQ ID NO:89);

(vi) hV_H 19a (SEQ ID NO:90) y hV_L 19a (SEQ ID NO:91);

(vii) hV_H 196b (SEQ ID NO:92) y hV_L 19b (SEQ ID NO:93); y

(viii) hV_H 19c (SEQ ID NO:94) y hV_L 19c (SEQ ID NO:95).

9. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 1** que se une específicamente a una región C-terminal de hPG.

10. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que se puede obtener usando un inmunógeno que comprende un antígeno peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:27.

11. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que compite para la unión a hPG con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

12. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que comprende las CDR de V_L y V_H correspondientes en secuencia a las CDR de V_L y V_H de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que

consiste en: 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

13. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que comprende las CDR de V_H y V_L que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de CDR de V_H y V_L:

(i) V_H CDR 1.8, V_H CDR 2.8, V_H CDR 3.8, V_L CDR 1.8, V_L CDR 2.8, y V_L CDR 3.8; y

(ii) V_H CDR 1.13, V_H CDR 2.13, V_H CDR 3.13, V_L CDR 1.13, V_L CDR 2.13, y V_L CDR 3.13.

14. Un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 9-13**, que es humanizado.

15. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 14** que comprende cadenas V_H y V_L que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de V_H y V_L:

(i) hV_H 8a (SEQ ID NO:75) y hV_L 8a (SEQ ID NO:76);

(ii) hV_H 8b (SEQ ID NO:77) y hV_L 8b (SEQ ID NO:78);

(iii) hV_H 8c (SEQ ID NO:79) y hV_L 8c (SEQ ID NO:76);

(iv) hV_H 13a (SEQ ID NO:80) y hV_L 13a (SEQ ID NO:81); y

(v) hV_H 13b (SEQ ID NO:82) y hV_L 13b (SEQ ID NO:83).

16. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15** que tiene una afinidad en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 7 nM.

17. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-8** que se une a un epítopo que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:28, 29, 30, 31, y 32.

18. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1 y 9-15** que se une a un epítopo que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:33, 34, 35, y 36.

19. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-8** que compite para la unión con hPG con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb1, anti-hPG MAb2, anti-hPG MAb3, anti-hPG MAb4, anti-hPG MAb15, anti-hPG MAb16, anti-hPG MAb17, anti-hPG MAb18, anti-hPG MAb19, y anti-hPG MAb20.

20. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1 y 9-15** que compite para la unión con hPG con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb5, anti-hPG MAb6, anti-hPG MAb7, anti-hPG MAb8, anti-hPG MAb9, anti-hPG MAb10, anti-hPG MAb11, anti-hPG MAb12, anti-hPG MAb13, anti-hPG MAb14, anti-hPG MAb21, anti-hPG MAb22, y anti-hPG MAb23.

21. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 1** que neutraliza la actividad de hPG en un ensayo *in vitro* realizado con células LS174T.

22. Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-21** y un excipiente, vehículo y/o diluyente.

23. La composición de la **reivindicación 22** que se formula para uso farmacéutico.

24. Un polinucleótido que codifica una cadena ligera variable (V_L) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**.

25. Un polinucleótido que codifica una cadena pesada variable (V_H) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**.

26. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera variable (V_L) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la **reivindicación 1**.

27. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada variable (V_H) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la **reivindicación 1**.

28. Una célula huésped transformada con pares de polinucleótidos adecuada para expresar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-21**.

29. Un hibridoma capaz de secretar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-21**.

30. El hibridoma de la **reivindicación 29** seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

31. El hibridoma de la **reivindicación 29**, que se selecciona del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

32. El hibridoma de la **reivindicación 29**, que se selecciona del grupo que consiste en: 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 2B4C8C8, 2B11E6G4, y 1E9A4A4.

33. Un método para obtener un anticuerpo monoclonal anti-hPG que comprende:

(a) cultivar un hibridoma de la **reivindicación 29** bajo condiciones adecuadas y

(b) recuperar el anticuerpo monoclonal anti-hPG del medio de cultivo o de las células de hibridoma.

34. Un método para tratar cáncer colorrectal que comprende administrar a un sujeto una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG humanizado neutralizante eficaz para tratar el cáncer colorrectal.

35. El método de la **reivindicación 34** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante compite para la unión con un anticuerpo monoclonal anti-hPG que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

36. El método de la **reivindicación 34** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante tiene CDR correspondientes en secuencia a las CDR de un anticuerpo monoclonal anti-hPG seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb1, anti-hPG MAb2, anti-hPG MAb3, anti-hPG MAb4, anti-hPG MAb5, anti-hPG MAb6, anti-hPG MAb7, anti-hPG MAb8, anti-hPG MAb9, anti-hPG MAb10, anti-hPG MAb11, anti-hPG MAb12, anti-hPG MAb13, anti-hPG MAb15, anti-hPG MAb16, anti-hPG MAb17, anti-hPG MAb18, anti-hPG MAb19, anti-hPG MAb20, anti-hPG MAb21, anti-hPG MAb22, o anti-hPG MAb23.

37. Un método para inhibir la proliferación de células de tumor colorrectal, que comprende exponer las células de tumor colorrectal a un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante.

38. El método de la **reivindicación 37** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante compite para la unión con un anticuerpo monoclonal anti-hPG que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7,

1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

39. El método de la **reivindicación 37** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante tiene CDR correspondientes en secuencia a las CDR de un anticuerpo monoclonal anti-hPG seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb1, anti-hPG MAb2, anti-hPG MAb3, anti-hPG MAb4, anti-hPG MAb5, anti-hPG MAb6, anti-hPG MAb7, anti-hPG MAb8, anti-hPG MAb9, anti-hPG MAb10, anti-hPG MAb11, anti-hPG MAb12, anti-hPG MAb13, anti-hPG MAb15, anti-hPG MAb16, anti-hPG MAb17, anti-hPG MAb18, anti-hPG MAb19, anti-hPG MAb20, anti-hPG MAb21, anti-hPG MAb22, o anti-hPG MAb23.

40. El método de la **reivindicación 37** que se realiza *in vitro*.

41. El método de la **reivindicación 37** que se realiza *in vivo*.

42. Un kit útil para detectar hPG, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal según la **reivindicación 2** y un anticuerpo se une específicamente a una región C-terminal de hPG.

43. El kit de la **reivindicación 42**, en el que el anticuerpo que se une específicamente a una región C-terminal de hPG es un anticuerpo policlonal.

44. Un kit útil para detectar hPG, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal según la **reivindicación 9** y un anticuerpo se une específicamente a una región N-terminal de hPG.

45. El kit de la **reivindicación 44**, en el que el anticuerpo que se une específicamente a una región N-terminal de hPG es un anticuerpo policlonal.

46. Un método para diagnosticar cáncer colorrectal en un sujeto, que comprende cuantificar la cantidad de progastrina en una muestra de suero del sujeto usando al menos un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**, en el que la cantidad de progastrina en un intervalo de aproximadamente 20 a 400 pM es indicativa de cáncer colorrectal.

47. Un método para seleccionar un paciente adecuado para terapia anti-hPG, que comprende cuantificar la cantidad de progastrina en una muestra de suero de un paciente con cáncer colorrectal, usando al menos un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**, en el que una cantidad de progastrina en un intervalo de aproximadamente 20 a 400 pM es indicativa de idoneidad para terapia anti-hPG.

48. Un método para monitorizar la eficacia de un tratamiento de cáncer colorrectal, que comprende cuantificar el nivel de progastrina en sangre de un sujeto que se está tratando para cáncer colorrectal, en función del tiempo, usando al menos un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**, en el que una disminución dependiente del tiempo del nivel de progastrina en el suero del paciente indica que el tratamiento es eficaz.

49. Un método para inhibir una cascada de transducción de la señal dependiente de progastrina en una célula, que comprende exponer una célula que secreta hPG a una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante eficaz para inhibir la transducción de la señal dependiente de progastrina.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción está dirigida a anticuerpos monoclonales de progastrina, a fragmentos de éstos, a composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales de progastrina y a métodos para preparar y usar los anticuerpos monoclonales de progastrina y composiciones de éstos. La presente descripción está dirigida a métodos para tratar cáncer colorrectal con anticuerpos monoclonales de progastrina y a composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales de progastrina o fragmentos de éstos. La presente descripción está dirigida además a métodos que comprenden la detección de progastrina, incluyendo métodos para diagnosticar cáncer colorrectal y métodos para monitorizar la eficacia de terapia anti-cancerosa en sujetos que padecen cáncer colorrectal.

FIG. 1

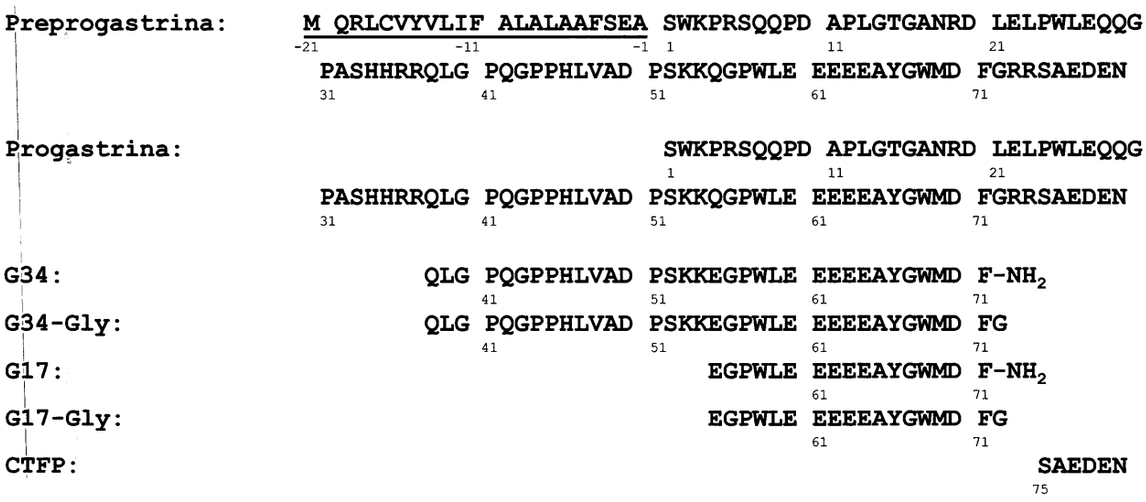

Preprogastrina:
M QRLCVYVLIF ALALAAFSEA SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
-21 -11 -1 1 11 21
PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
31 41 51 61 71
Progastrina:
SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
1 11 21
PASHHRRQLG PQGPPHLVAD PSKKQGPWLE EEEEAYGWMD FGRRSAEDEN
31 41 51 61 71
G34:
QLG PQGPPHLVAD PSKKEGPWLE EEEEAYGWMD F-NH2
41 51 61 71
G34-Gly:
QLG PQGPPHLVAD PSKKEGPWLE EEEEAYGWMD FG
41 51 61 71
G17:
EGPWLE EEEEAYGWMD F-NH2
61 71
G17-Gly:
EGPWLE EEEEAYGWMD FG
61 71
CTFP:
SAEDEN
75

FIG. 2A

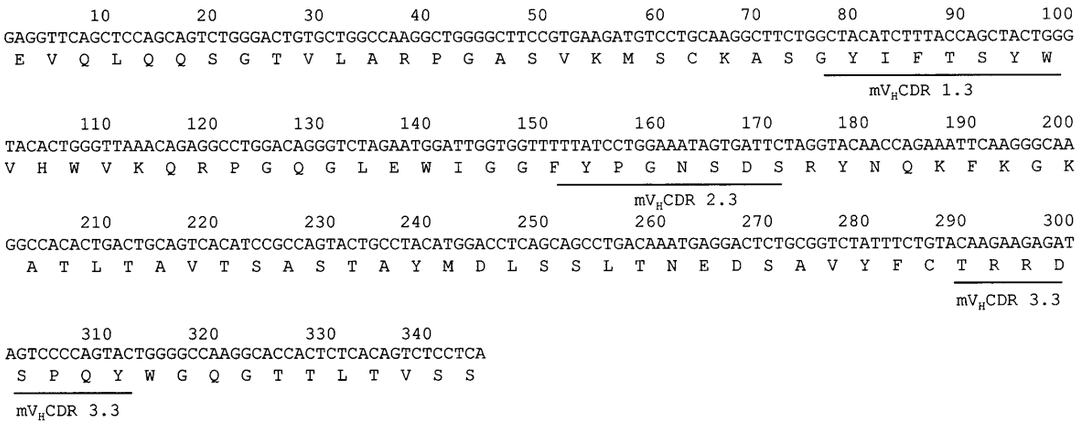

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GAGGTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCCAAGGCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTTACCAGCTACTGGG
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y I F T S Y W
mV$_H$CDR 1.3
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TACACTGGGTTAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGGTTTTTATCCTGGAAATAGTGATTCTAGGTACAACCAGAAATTCAAGGGCAA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

FIG. 2B

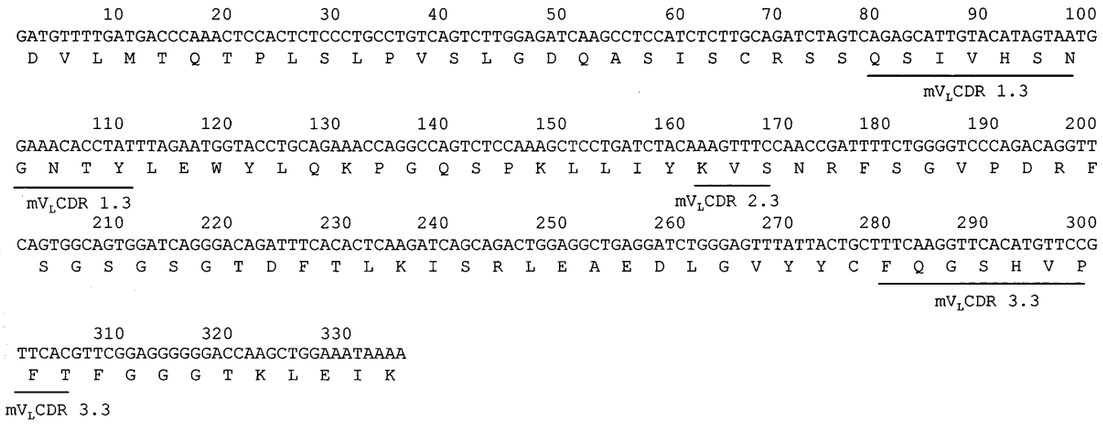

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATG
D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N
mV$_L$CDR 1.3
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT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

FIG. 2C

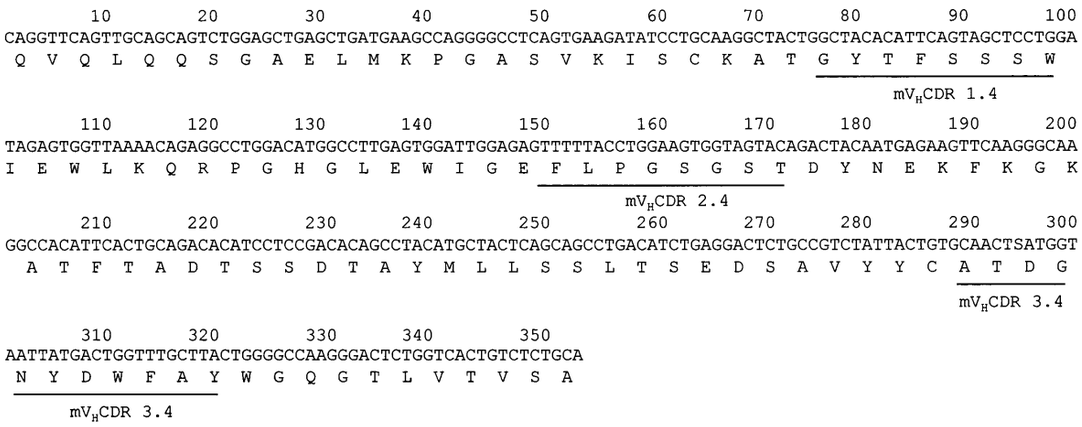

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
CAGGTTCAGTTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCAGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAGCTCCTGGA
Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K A T G Y T F S S S W
mV$_H$CDR 1.4
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TAGAGTGGTTAAAACAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGTTTTTACCTGGAAGTGGTAGTACAGACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAA
I E W L K Q R P G H G L E W I G E F L P G S G S T D Y N E K F K G K
mV$_H$CDR 2.4
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GGCCACATTCACTGCAGACACATCCTCCGACACAGCCTACATGCTACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAACTSATGGT
A T F T A D T S S D T A Y M L L S S L T S E D S A V Y Y C A T D G
mV$_H$CDR 3.4
310 320 330 340 350
AATTATGACTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
N Y D W F A Y W G Q G T L V T V S A
mV$_H$CDR 3.4

FIG. 2D

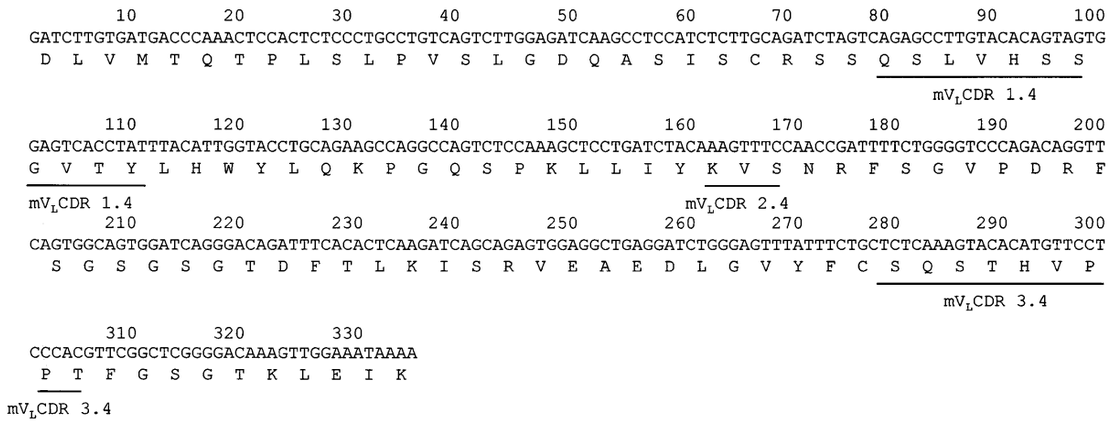

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GATCTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAGTG
D L V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S S
mV$_L$CDR 1.4
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GAGTCACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT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

FIG. 2E

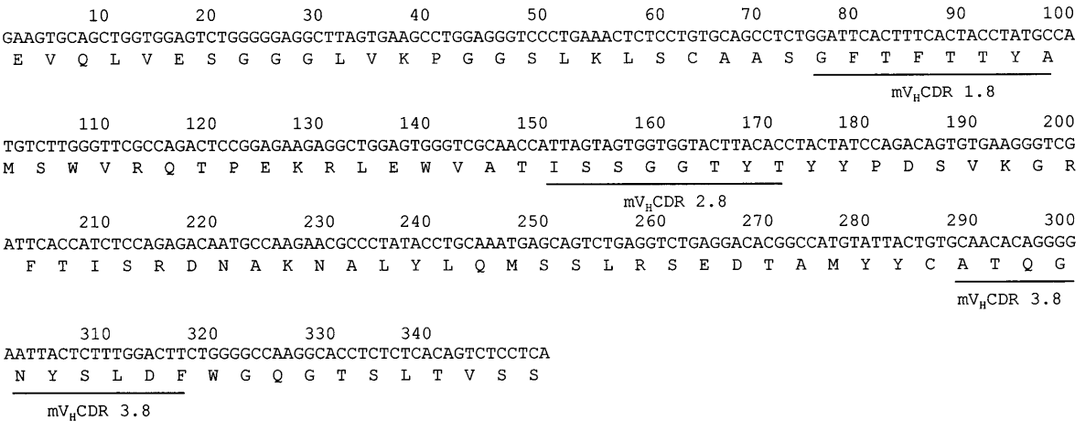

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCACTACCTATGCCA
E V Q L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F T T Y A
mV$_H$CDR 1.8
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTACTTACACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCG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

FIG. 2F

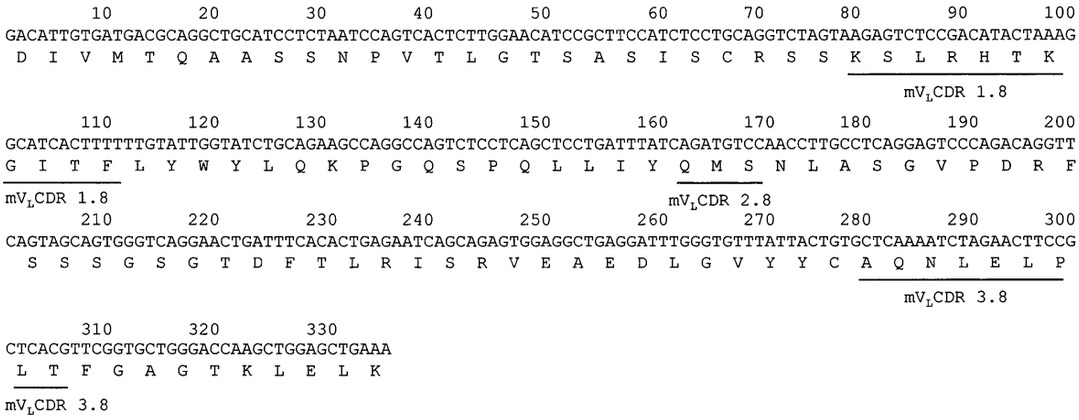

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GACATTGTGATGACGCAGGCTGCATCCTCTAATCCAGTCACTCTTGGAACATCCGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCGACATACTAAAG
D I V M T Q A A S S N P V T L G T S A S I S C R S S K S L R H T K
mV$_L$CDR 1.8
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GCATCACTTTTTTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATTTATCAGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTT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

FIG. 2G

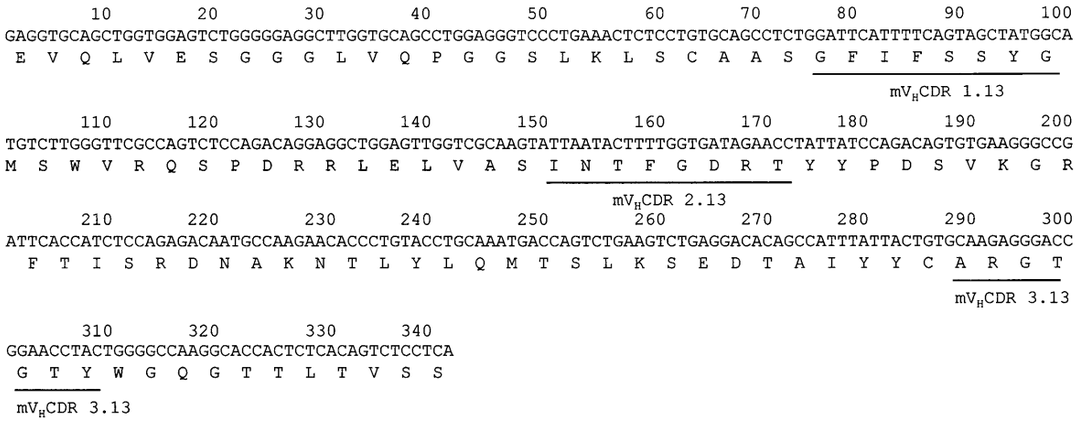

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCATTTTCAGTAGCTATGGCA
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y G
mV$_H$CDR 1.13
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TGTCTTGGGTTCGCCAGTCTCCAGACAGGAGGCTGGAGTTGGTCGCAAGTATTAATACTTTTGGTGATAGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG
M S W V R Q S P D R R L E L V A S I N T F G D R T Y Y P D S V K G R
mV$_H$CDR 2.13
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGACCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATTTATTACTGTGCAAGAGGGACC
F T I S R D N A K N T L Y L Q M T S L K S E D T A I Y Y C A R G T
mV$_H$CDR 3.13
310 320 330 340
GGAACCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
G T Y W G Q G T T L T V S S
mV$_H$CDR 3.13

FIG. 2H

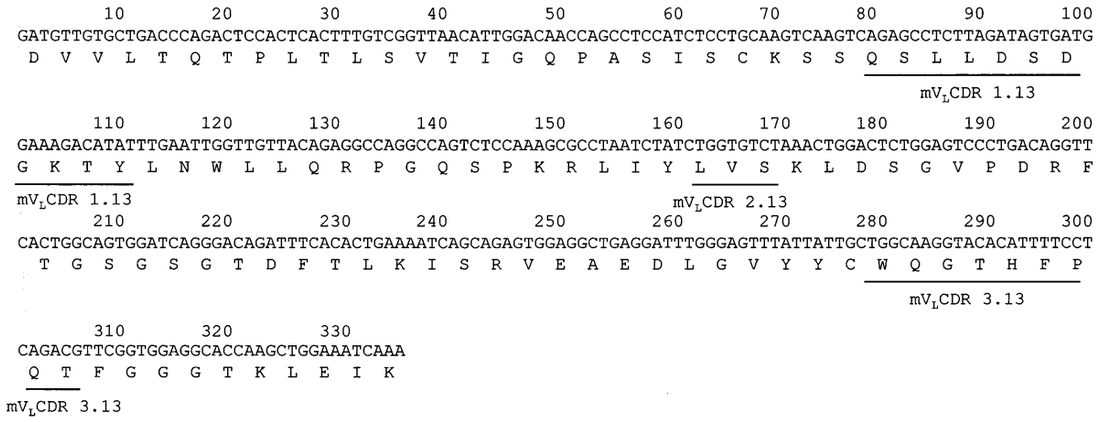

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GATGTTGTGCTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTAACATTGGACAACCAGCCTCCATCTCCTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG
D V V L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L L D S D
mV$_L$CDR 1.13
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTT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

FIG. 2I

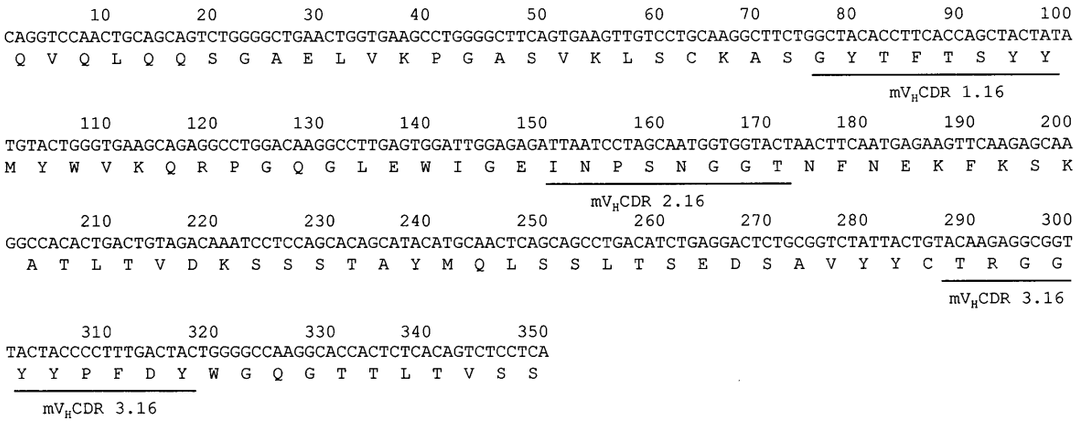

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
CAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTATA
Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y Y
mV$_H$CDR 1.16
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAATGGTGGTACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGCAA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

FIG. 2J

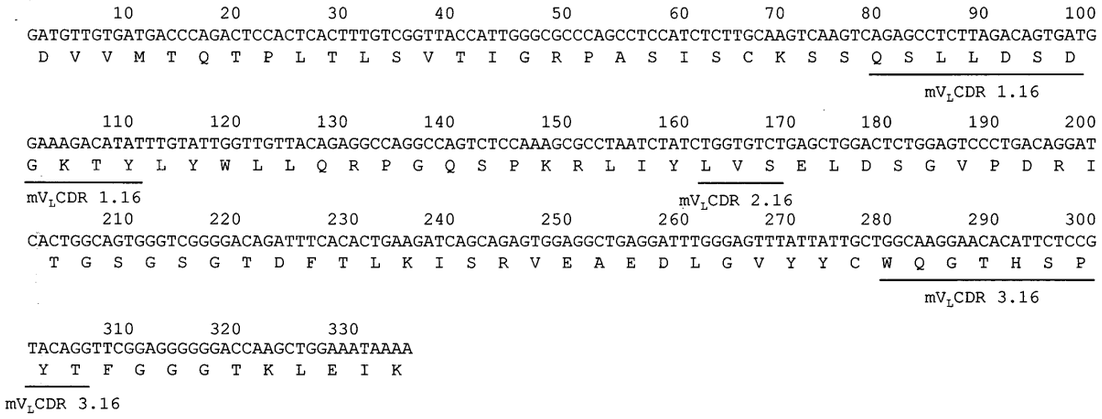

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGGCGCCCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGACAGTGATG
D V V M T Q T P L T L S V T I G R P A S I S C K S S Q S L L D S D
mV$_L$CDR 1.16
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
GAAAGACATATTTGTATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTGAGCTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGAT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

FIG. 2K

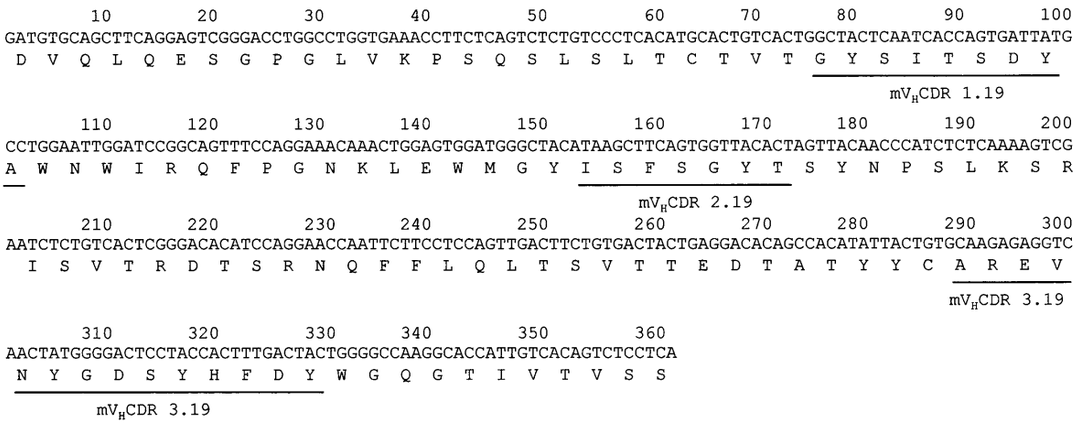

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACATGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATG
D V Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T G Y S I T S D Y
mV$_H$CDR 1.19
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
CCTGGAATTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTTCAGTGGTTACACTAGTTACAACCCATCTCTCAAAAGTCG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

FIG. 2L

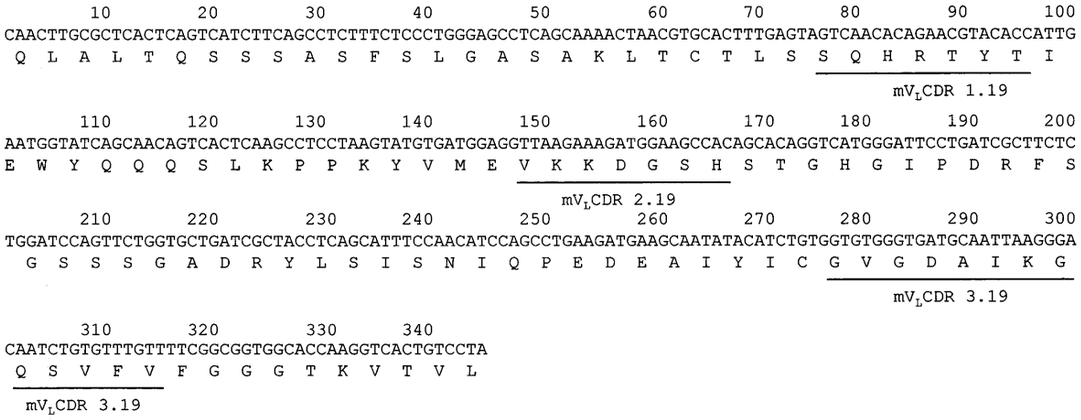

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
CAACTTGCGCTCACTCAGTCATCTTCAGCCTCTTTCTCCCTGGGAGCCTCAGCAAAACTAACGTGCACTTTGAGTAGTCAACACAGAACGTACACCATTG
Q L A L T Q S S S A S F S L G A S A K L T C T L S S Q H R T Y T I
mV$_L$CDR 1.19
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
AATGGTATCAGCAACAGTCACTCAAGCCTCCTAAGTATGTGATGGAGGTTAAGAAAGATGGAAGCCACAGCACAGGTCATGGGATTCCTGATCGCTTCTC
E W Y Q Q Q S L K P P K Y V M E V K K D G S H S T G H G I P D R F S
mV$_L$CDR 2.19
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
TGGATCCAGTTCTGGTGCTGATCGCTACCTCAGCATTTCCAACATCCAGCCTGAAGATGAAGCAATATACATCTGTGGTGTGGGTGATGCAATTAAGGGA
G S S S G A D R Y L S I S N I Q P E D E A I Y I C G V G D A I K G
mV$_L$CDR 3.19
310 320 330 340
CAATCTGTGTTTGTTTTCGGCGGTGGCACCAAGGTCACTGTCCTA
Q S V F V F G G G T K V T V L
mV$_L$CDR 3.19

FIG. 3A

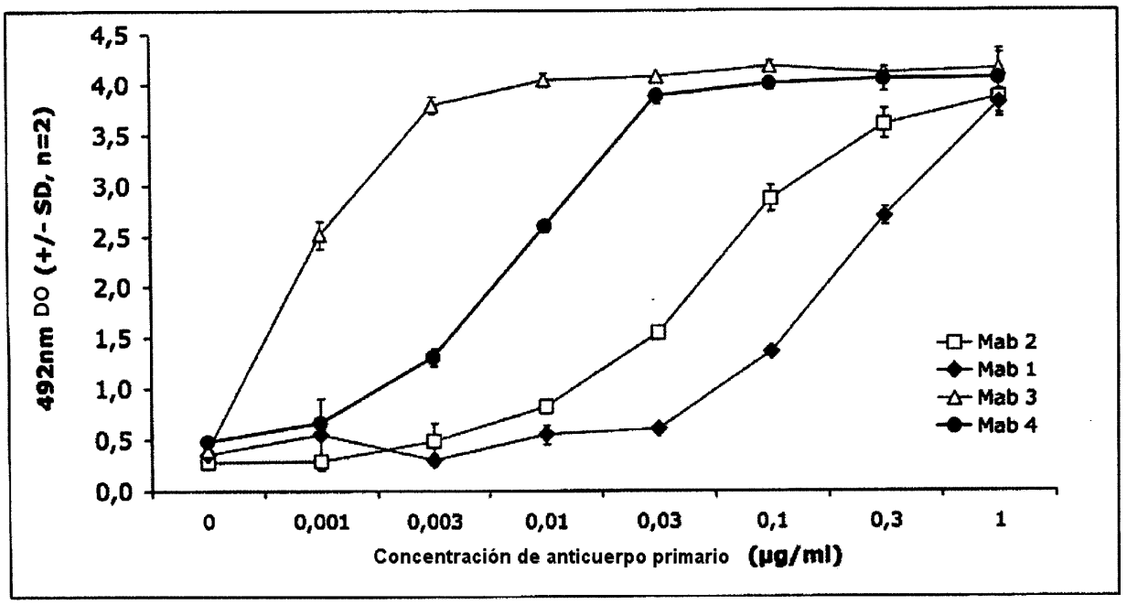

4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
492nm DO (+/- SD, n=2)
0
0,001
0,003
0,01
0,03
0,1
0,3
1
Concentración de anticuerpo primario (µg/ml)
Mab 2
Mab 1
Mab 3
Mab 4

FIG. 3B

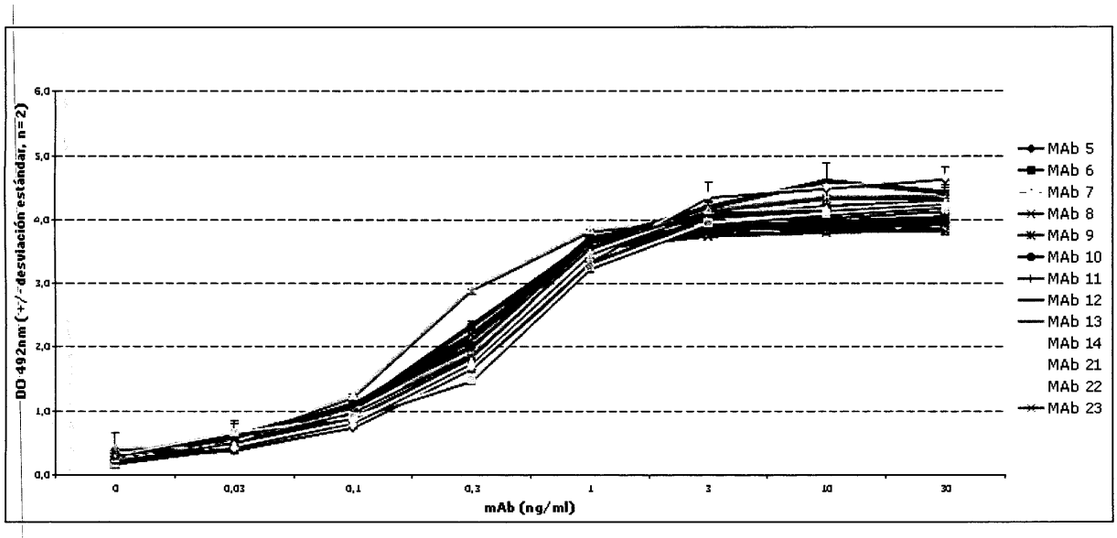

DO 492nm (+/- desviación estándar, n=2)
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
0
0,03
0,1
0,3
1
3
10
30
mAb (ng/ml)
MAb 5
MAb 6
MAb 7
MAb 8
MAb 9
MAb 10
MAb 11
MAb 12
MAb 13
MAb 14
MAb 21
MAb 22
MAb 23

FIG. 3C

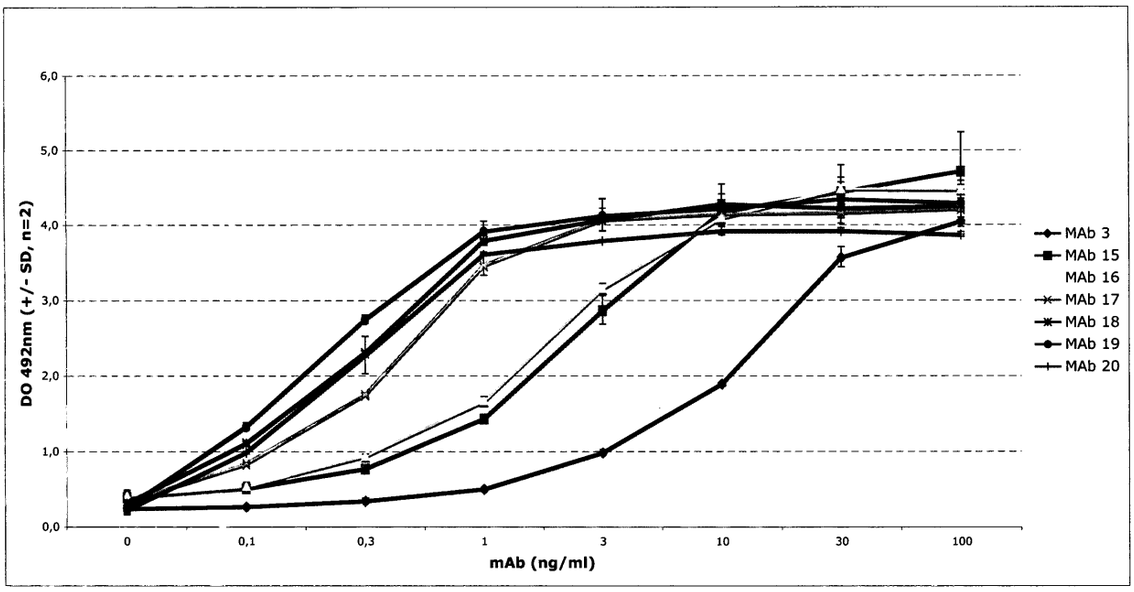

6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
DO 492nm (+/- SD, n=2)
0
0,1
0,3
1
3
10
30
100
mAb (ng/ml)
MAb 3
MAb 15
MAb 16
MAb 17
MAb 18
MAb 19
MAb 20

FIG. 4

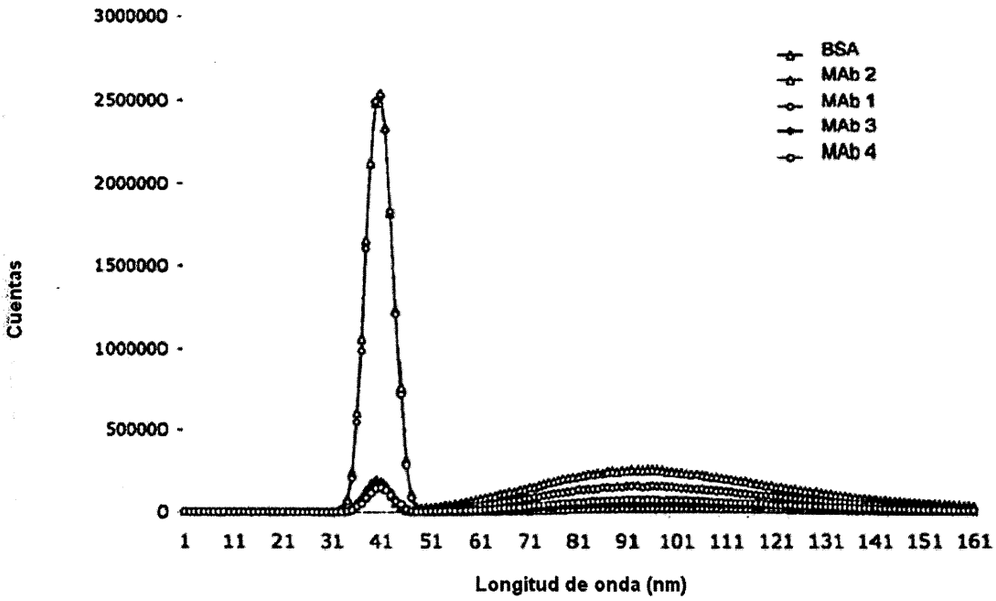

3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
Cuentas
1
11
21
31
41
51
61
71
81
91
101
111
121
131
141
151
161
Longitud de onda (nm)
BSA
MAb 2
MAb 1
MAb 3
MAb 4

FIG. 5A

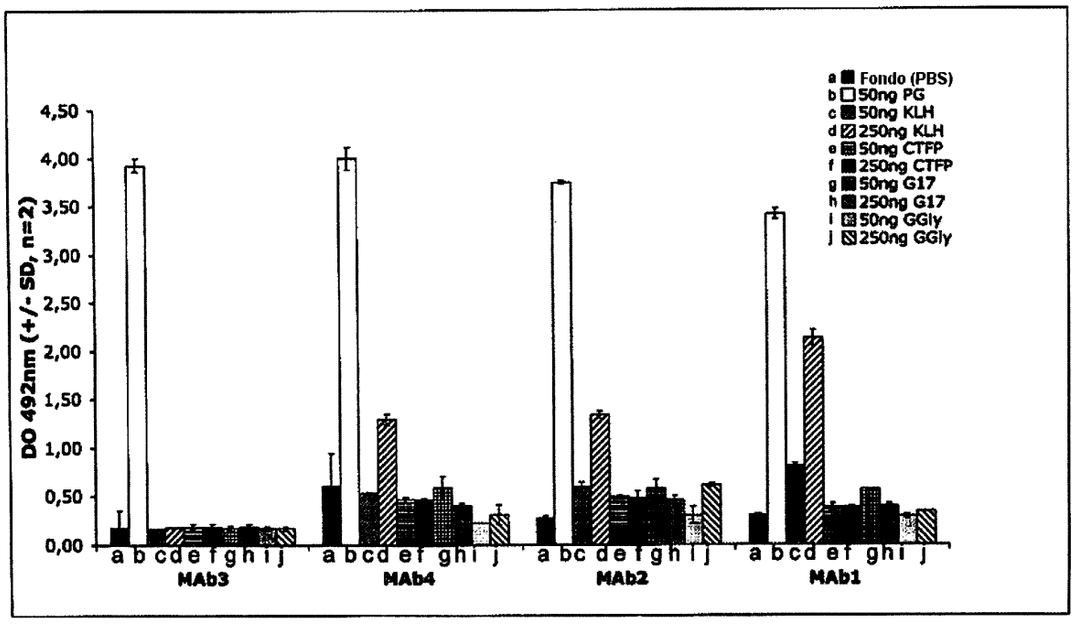
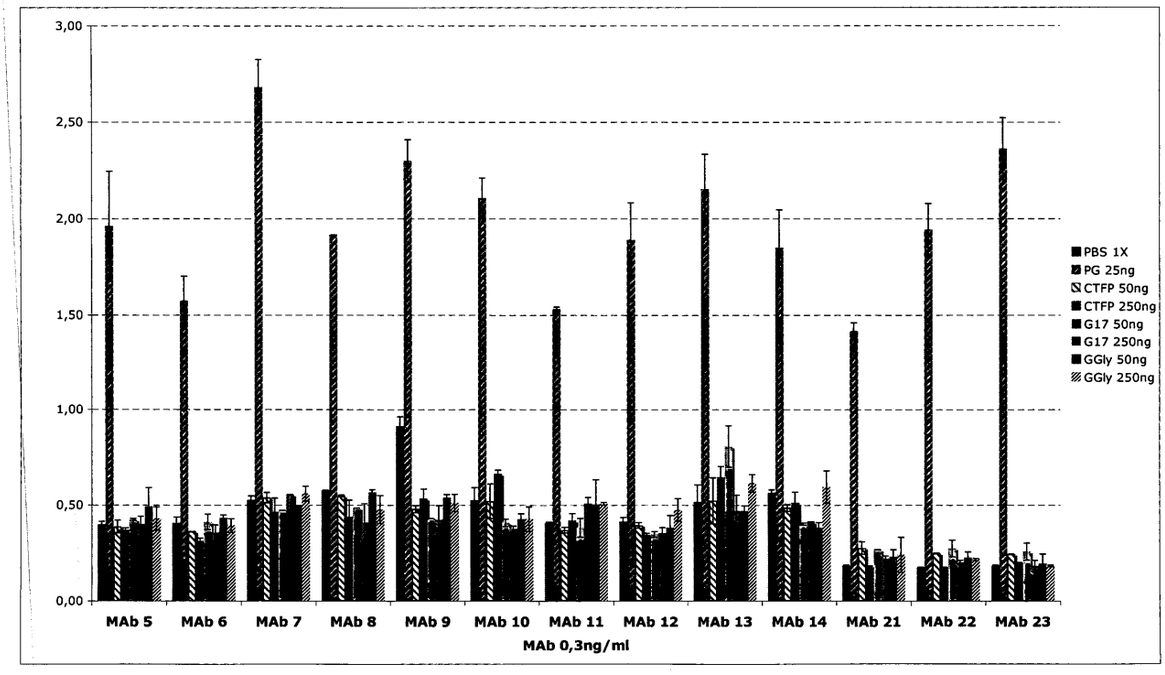

a Fondo (PBS)
b 50ng PG
c 50ng KLH
d 250ng KLH
e 50ng CTFP
f 250ng CTFP
g 50ng G17
h 250ng G17
i 50ng GGIy
j 250ng GGIy
DO 492nm (+/- SD, n=2)
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
a b c d e f g h i j
MAb3
a b c d e f g h i j
MAb4
a b c d e f g h i j
MAb2
a b c d e f g h i j
MAb1

FIG. 5B


3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
MAb 5
MAb 6
MAb 7
MAb 8
MAb 9
MAb 10
MAb 11
MAb 12
MAb 13
MAb 14
MAb 21
MAb 22
MAb 23
MAb 0,3ng/ml
PBS 1X
PG 25ng
CTFP 50ng
CTFP 250ng
G17 50ng
G17 250ng
GGly 50ng
GGly 250ng

69

FIG. 5C

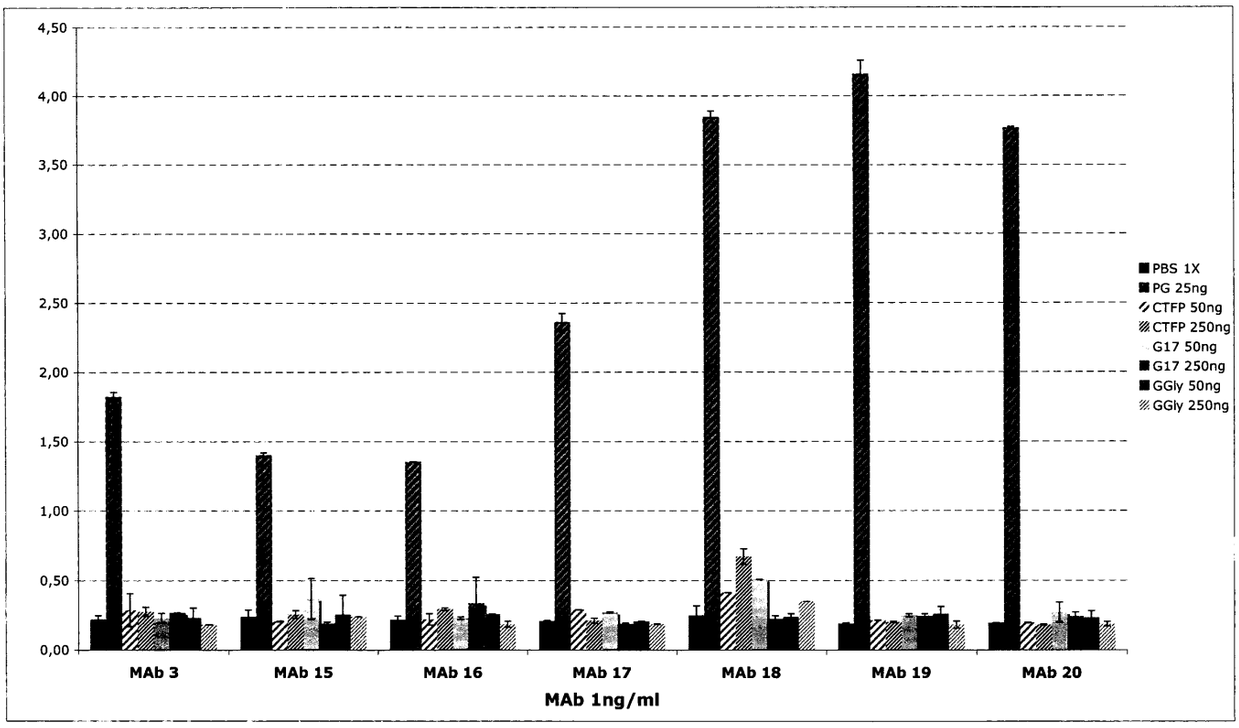

4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
MAb 3
MAb 15
MAb 16
MAb 17
MAb 18
MAb 19
MAb 20
MAb 1ng/ml
PBS 1X
PG 25ng
CTFP 50ng
CTFP 250ng
G17 50ng
G17 250ng
GGly 50ng
GGly 250ng

FIG. 6

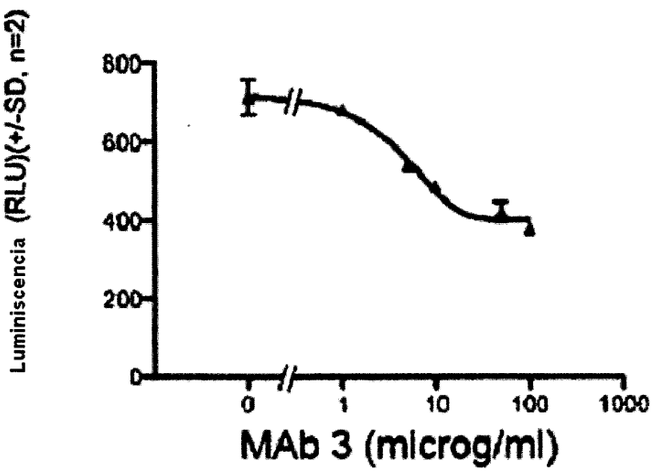

Luminiscencia (RLU)(+/-SD, n=2)
800
600
400
200
0
0
1
10
100
1000
MAb 3 (microg/ml)

FIG. 7A

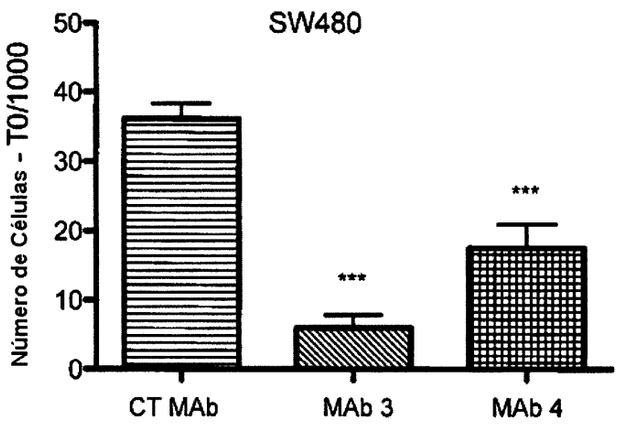
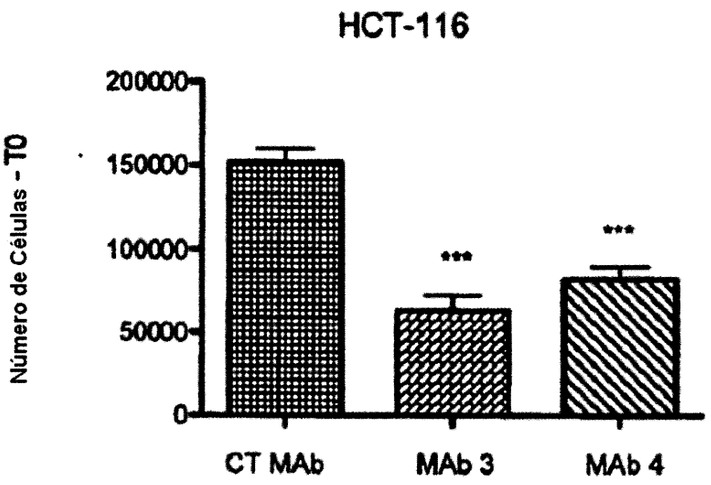

SW480
Número de Células - T0/1000
50
40
30
20
10
0
***
***
CT MAb
MAb 3
MAb 4

FIG. 7B


HCT-116
Número de Células - T0
200000
150000
100000
50000
0
***
***
CT MAb
MAb 3
MAb 4

47

FIG. 7C

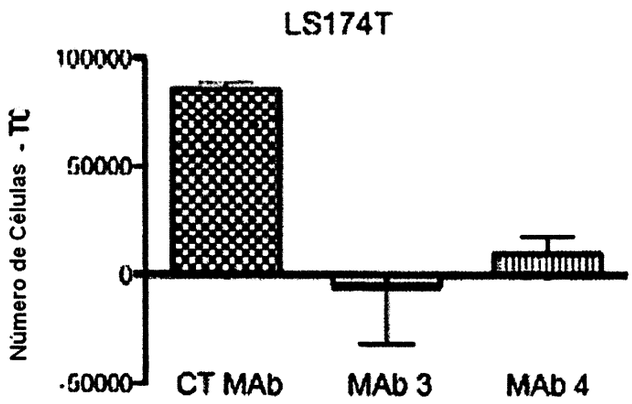

LS174T
100000
50000
0
-50000
Número de Células - TC
CT MAb
MAb 3
MAb 4

FIG. 7D

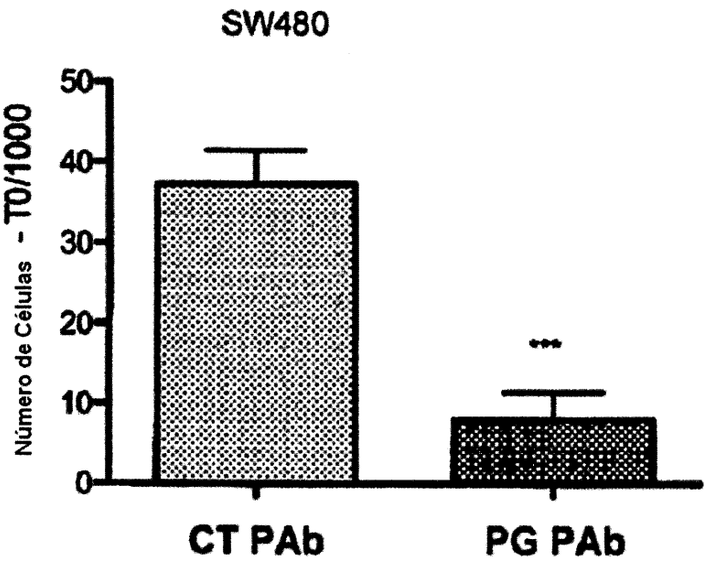


FIG. 7E

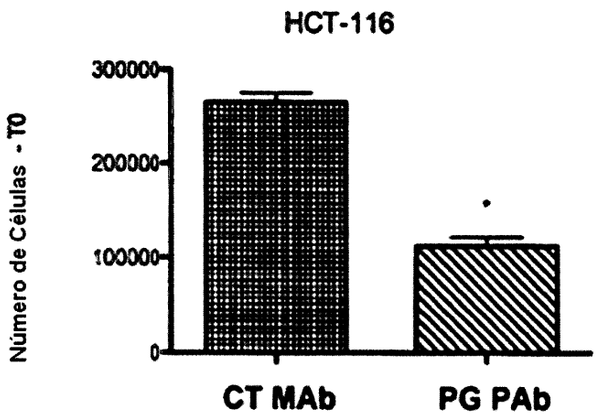

HCT-116
Número de Células - T0
300000
200000
100000
0
CT MAb
PG PAb

FIG. 7F

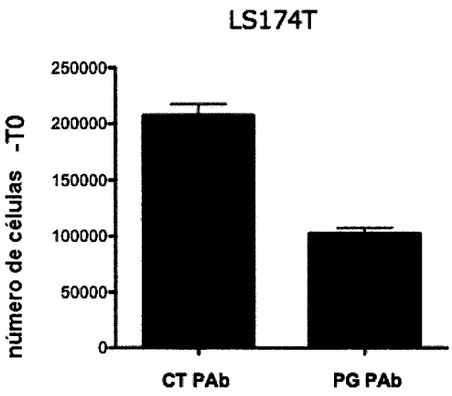

LS174T
número de células -T0
250000
200000
150000
100000
50000
0
CT PAb
PG PAb

FIG. 7G

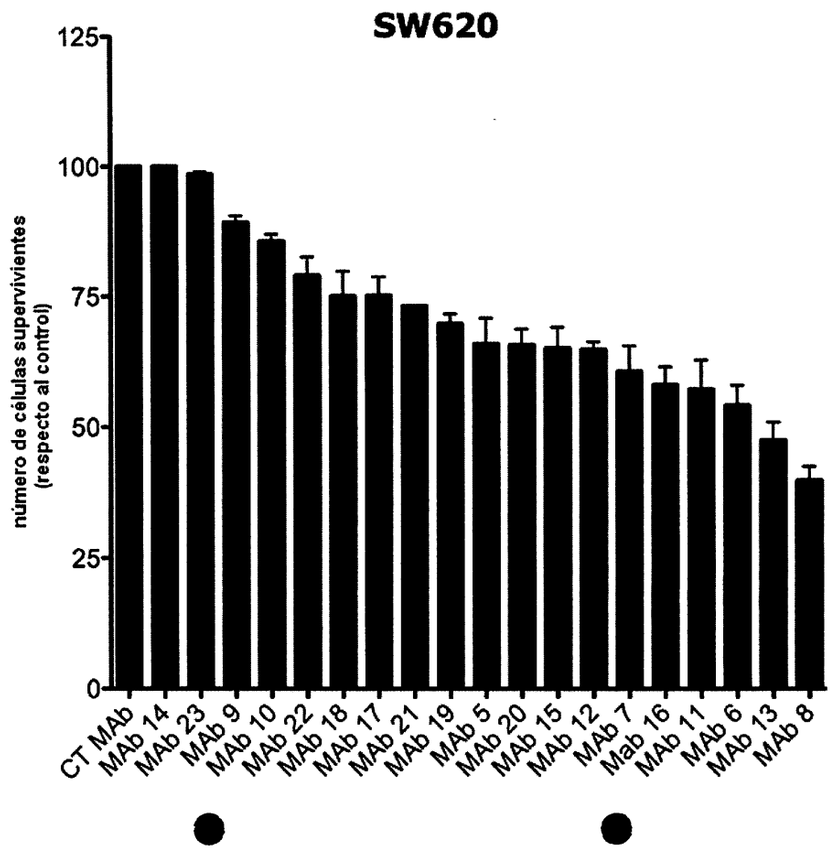
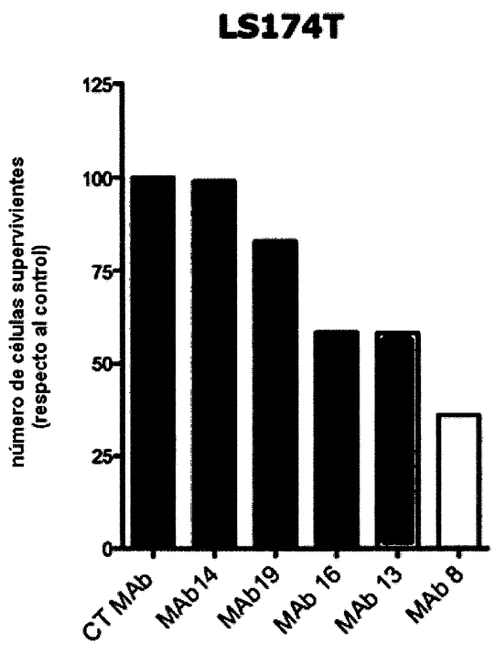

SW620
número de células supervivientes (respecto al control)
125
100
75
50
25
0
CT MAb
MAb 14
MAb 23
MAb 9
MAb 10
MAb 22
MAb 18
MAb 17
MAb 21
MAb 19
MAb 5
MAb 20
MAb 15
MAb 12
MAb 7
Mab 16
MAb 11
MAb 6
MAb 13
MAb 8

FIG. 7H


LS174T
número de células supervivientes (respecto al control)
125
100
75
50
25
0
CT MAb
MAb14
MAb19
MAb 16
MAb 13
MAb 8

74

FIG. 7I

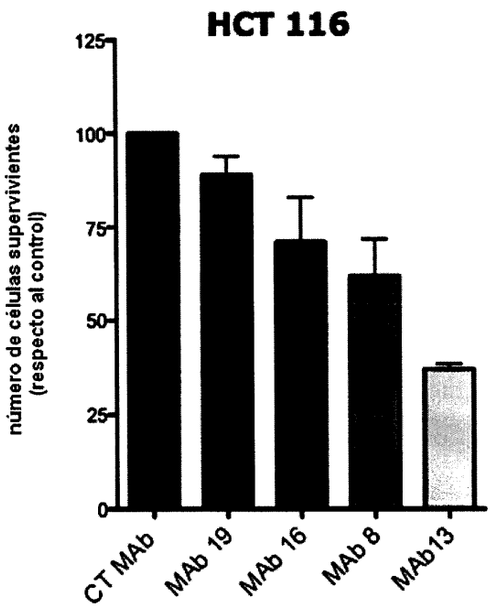

HCT 116
número de células supervivientes (respecto al control)
125
100
75
50
25
0
CT MAb
MAb 19
MAb 16
MAb 8
MAb13

FIG. 8

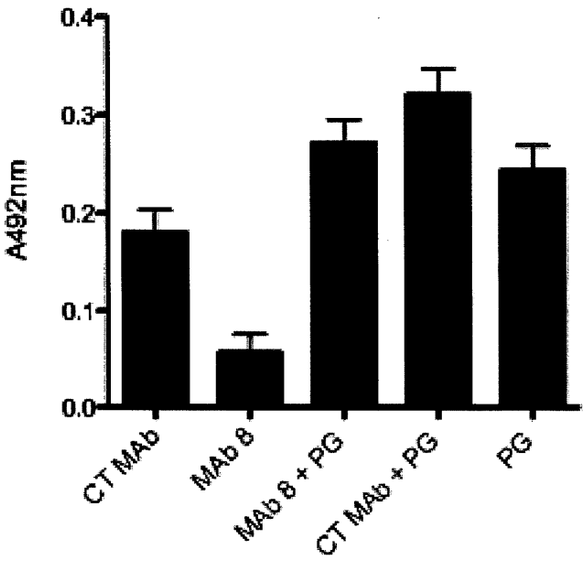


FIG. 9A

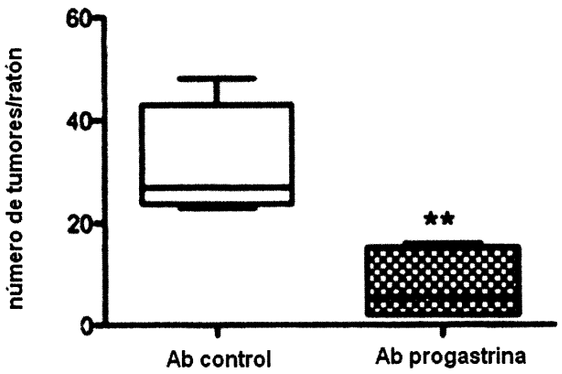
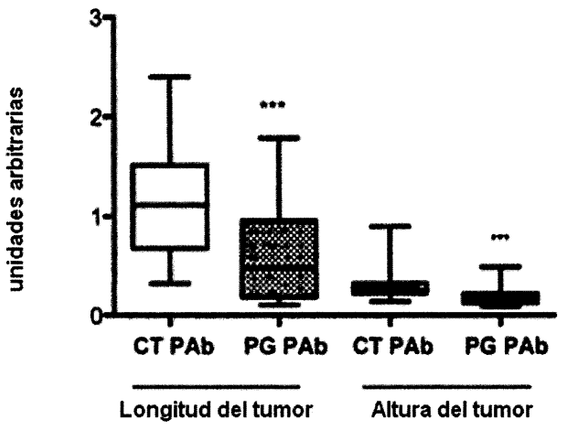


FIG. 9B


unidades arbitrarias
3
2
1
0
***
***
CT PAb
PG PAb
CT PAb
PG PAb
Longitud del tumor
Altura del tumor

SEQUENCE LISTING

<110> BIOREALITES, S.A.S.
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

<120> MONOCLONAL ANTIBODIES TO PROGASTRIN AND THEIR USES

<130> 382657-001WO

<140>
<141>

<150> 61/252,625
<151> 2009-10-16

<160> 99

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 5
Lys Val Ser
1

<210> 6
<211> 9

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9
Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10
Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Val Thr Tyr
1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 12
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 13
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15
Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85 90 95

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

<210> 16
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 16
gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg cct ggg gct 48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

tcc gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac atc ttt acc agc tac 96
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

tgg gta cac tgg gtt aaa cag agg cct gga cag ggt cta gaa tgg att 144
Trp Val His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggt ggt ttt tat cct gga aat agt gat tct agg tac aac cag aaa ttc 192
Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ctg act gca gtc aca tcc gcc agt act gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gac ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt 288
Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

aca aga aga gat agt ccc cag tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca 336
Thr Arg Arg Asp Ser Pro Gln Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

100 105 110

gtc tcc tca 345
Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 17
gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat agt 96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

agc aga ctg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt 288
Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

tca cat gtt ccg ttc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 18
<211> 354
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 18
cag gtt cag ttg cag cag tct gga gct gag ctg atg aag cca ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag ata tcc tgc aag gct act ggc tac aca ttc agt agc tcc 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

tgg ata gag tgg tta aaa cag agg cct gga cat ggc ctt gag tgg att 144
Trp Ile Glu Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga gag ttt tta cct gga agt ggt agt aca gac tac aat gag aag ttc 192
Gly Glu Phe Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

aag ggc aag gcc aca ttc act gca gac aca tcc tcc gac aca gcc tac 240
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg cta ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt 288
Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca act gat ggt aat tat gac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act 336
Ala Thr Asp Gly Asn Tyr Asp Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

ctg gtc act gtc tct gca 354
Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 19
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 19
gat ctt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt 96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

agt gga gtc acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Ser Gly Val Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 20

82

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

<400> 20
Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Thr Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

<210> 21
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Gly Phe Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Ser Arg Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 22
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 23
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

1 5 10

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Ahx

<400> 26
Ser Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly Xaa Cys
1 5 10 15

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

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

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

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

<400> 28
Asp Ala Pro Leu Gly
1 5

<210> 29

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

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

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

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

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

<400> 31
Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp
1 5

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

<400> 32
Trp Lys Pro Arg Ser Gln Gln Pro Asp Ala Pro Leu Gly
1 5 10

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

<400> 33
Phe Gly Arg Arg
1

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

<400> 34
Met Asp Phe Gly Arg
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Ala Glu Asp Glu Asn
1 5

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

<400> 36
Gly Trp Met Asp Phe Gly Arg Arg
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 37
Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Ala
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

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

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44
Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr

1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 48

<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49
Lys Ser Leu Arg His Thr Lys Gly Ile Thr Phe
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 50
Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51
Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
1 5

<210> 52
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52
Gln Met Ser
1

<210> 53
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53
Leu Val Ser
1

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 54
Val Lys Lys Asp Gly Ser His
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 59
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 61
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 61
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 62

<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 62
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 63
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 64
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 64
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 65
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 66
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 66
Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Leu
115

<210> 67
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 67
gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc act acc tat 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

gcc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc 144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag ggt cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac gcc cta tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg agc agt ctg agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aca cag ggg aat tac tct ttg gac ttc tgg ggc caa ggc acc tct 336
Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 342
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 68
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct gga ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc agt agc tat 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc atg tct tgg gtt cgc cag tct cca gac agg agg ctg gag ttg gtc 144
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Asp Arg Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

gca agt att aat act ttt ggt gat aga acc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg acc agt ctg aag tct gag gac aca gcc att tat tac tgt 288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga ggg acc gga acc tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc 336
Ala Arg Gly Thr Gly Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

tcc tca 342
Ser Ser

<210> 69
<211> 351
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 69
cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac 96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

tat atg tac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att 144
Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga gag att aat cct agc aat ggt ggt act aac ttc aat gag aag ttc 192
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gca tac 240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

aca aga ggc ggt tac tac ccc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act 336
Thr Arg Gly Gly Tyr Tyr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 363
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 70
gat gtg cag ctt cag gag tcg gga cct ggc ctg gtg aaa cct tct cag 48
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

tct ctg tcc ctc aca tgc act gtc act ggc tac tca atc acc agt gat 96
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

tat gcc tgg aat tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag tgg 144
Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

atg ggc tac ata agc ttc agt ggt tac act agt tac aac cca tct ctc 192
Met Gly Tyr Ile Ser Phe Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

aaa agt cga atc tct gtc act cgg gac aca tcc agg aac caa ttc ttc 240
Lys Ser Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Arg Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

ctc cag ttg act tct gtg act act gag gac aca gcc aca tat tac tgt 288
Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga gag gtc aac tat ggg gac tcc tac cac ttt gac tac tgg ggc 336
Ala Arg Glu Val Asn Tyr Gly Asp Ser Tyr His Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

caa ggc acc att gtc aca gtc tcc tca 363
Gln Gly Thr Ile Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 71
gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

cta gaa ctt ccg ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 336
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 72
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 72
gat gtt gtg ctg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att gga 48
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 73
<211> 336

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 73
gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att ggg 48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

aca cat tct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336
Thr His Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 74
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

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

<400> 74
caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc 48
Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc 96
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Arg Thr Tyr Thr
20 25 30

att gaa tgg tat cag caa cag tca ctc aag cct cct aag tat gtg atg 144
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Ser Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
35 40 45

gag gtt aag aaa gat gga agc cac agc aca ggt cat ggg att cct gat 192
Glu Val Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly His Gly Ile Pro Asp
50 55 60

cgc ttc tct gga tcc agt tct ggt gct gat cgc tac ctc agc att tcc 240
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65 70 75 80

aac atc cag cct gaa gat gaa gca ata tac atc tgt ggt gtg ggt gat 288
Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
85 90 95

gca att aag gga caa tct gtg ttt gtt ttc ggc ggt ggc acc aag gtc 336
Ala Ile Lys Gly Gln Ser Val Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

act gtc cta 345
Thr Val Leu
115

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 75
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 76
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 77
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 77
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 78
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

65 70 75 80

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

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

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 79
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 80
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 81

<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 81
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 82
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 82

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 83
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 84
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 84
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 85
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 86
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 86
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 87
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 87
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 88
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 88
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 89
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 90
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<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> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 91
Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp

85 90 95

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

Glu Ile Lys
115

<210> 92
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 92
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 93
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 93
Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
115

<210> 94

<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 94
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 95
Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
115

<210> 96
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220>
<221> MOD_RES

<222> (2)..(3)
<223> Ahx

<400> 96
Cys Xaa Xaa Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly
1 5 10 15

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

<210> 97
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(3)
<223> Ahx

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

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

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

<210> 99
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

ANEXO No. 2

REIVINDICACIONES

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la progastrina humana (hPG).

2. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 1** que se une específicamente a una región N-terminal de hPG.

3 El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que se puede obtener usando un inmunógeno que comprende un antígeno peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:25.

4. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que compite para la unión a hPG con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, y 1C11F5E8.

5. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que comprende las CDR de V_L y V_H correspondientes en secuencias a las CDR de V_L y V_H de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, y 1C11F5E8.

6. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 2** que comprende las CDR de V_L y V_H que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de CDR de V_L y V_H:

(i) V_H CDR1.3, V_H CDR 2.3, V_H CDR 3.3, V_L CDR 1.3, V_L CDR 2.3, y V_L CDR 3.3;

(ii) V_H CDR 1.4, V_H CDR 2.4, V_H CDR 3.4, V_L CDR 1.4, V_L CDR 2.4, y V_L CDR 3.4;

(iii) V_H CDR 1.16, V_H CDR 2.16, V_H CDR 3.16, V_L CDR 1.16, V_L CDR 2.16, y, V_L CDR 3.16; y

102

(iv) V_H CDR 1.19, V_H CDR 2.19, V_H CDR 3.19, V_L CDR 1.19, V_L CDR 2.19, y V_L CDR 3.19.

7. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-6**, que es humanizado.

8. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 7** que comprende cadenas V_H y V_L que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de V_H y V_L:

(i) hV_H 3 (SEQ ID NO:21) y hV_L 3 (SEQ ID NO:22);
(ii) hV_H 4 (SEQ ID NO:23) y hV_L 4 (SEQ ID NO:24);
(iii) hV_H 16a (SEQ ID NO:84) y hV_L 16a (SEQ ID NO:85);
(iv) hV_H 16b (SEQ ID NO:86) y hV_L 16b (SEQ ID NO:87);
(v) hV_H 16c (SEQ ID NO:88) y hV_L 16c (SEQ ID NO:89);
(vi) hV_H 19a (SEQ ID NO:90) y hV_L 19a (SEQ ID NO:91);
(vii) hV_H 196b (SEQ ID NO:92) y hV_L 19b (SEQ ID NO:93); y
(viii) hV_H 19c (SEQ ID NO:94) y hV_L 19c (SEQ ID NO:95).

9. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 1** que se une específicamente a una región C-terminal de hPG.

10. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que se puede obtener usando un inmunógeno que comprende un antígeno peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:27.

11. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que compite para la unión a hPG con un anticuerpo monoclonal anti-hPG de referencia que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

12. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que comprende las CDR de V_L y V_H correspondientes en secuencia a las CDR de V_L y V_H de los anticuerpos monoclonales que se pueden obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que

109

consiste en: 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

13. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 9** que comprende las CDR de V_H y V_L que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de CDR de V_H y V_L:

(i) V_H CDR 1.8, V_H CDR 2.8, V_H CDR 3.8, V_L CDR 1.8, V_L CDR 2.8, y V_L CDR 3.8; y

(ii) V_H CDR 1.13, V_H CDR 2.13, V_H CDR 3.13, V_L CDR 1.13, V_L CDR 2.13, y V_L CDR 3.13.

14. Un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 9-13**, que es humanizado.

15. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 14** que comprende cadenas V_H y V_L que tienen secuencias seleccionadas de uno de los grupos siguientes de secuencias de V_H y V_L:

(i) hV_H 8a (SEQ ID NO:75) y hV_L 8a (SEQ ID NO:76);

(ii) hV_H 8b (SEQ ID NO:77) y hV_L 8b (SEQ ID NO:78);

(iii) hV_H 8c (SEQ ID NO:79) y hV_L 8c (SEQ ID NO:76);

(iv) hV_H 13a (SEQ ID NO:80) y hV_L 13a (SEQ ID NO:81); y

(v) hV_H 13b (SEQ ID NO:82) y hV_L 13b (SEQ ID NO:83).

16. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15** que tiene una afinidad en el intervalo de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 7 nM.

17. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-8** que se une a un epítopo que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:28, 29, 30, 31, y 32.

18. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1 y 9-15** que se une a un epítopo que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:33, 34, 35, y 36.

19. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1-8** que compite para la unión con hPG con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb1, anti-hPG MAb2, anti-hPG MAb3, anti-hPG MAb4, anti-hPG MAb15, anti-hPG MAb16, anti-hPG MAb17, anti-hPG MAb18, anti-hPG MAb19, y anti-hPG MAb20.

20. El anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las **reivindicaciones 1 y 9-15** que compite para la unión con hPG con un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb5, anti-hPG MAb6, anti-hPG MAb7, anti-hPG MAb8, anti-hPG MAb9, anti-hPG MAb10, anti-hPG MAb11, anti-hPG MAb12, anti-hPG MAb13, anti-hPG MAb14, anti-hPG MAb21, anti-hPG MAb22, y anti-hPG MAb23.

21. El anticuerpo monoclonal de la **reivindicación 1** que neutraliza la actividad de hPG en un ensayo *in vitro* realizado con células LS174T.

22. Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-21** y un excipiente, vehículo y/o diluyente.

23. La composición de la **reivindicación 22** que se formula para uso farmacéutico.

24. Un polinucleótido que codifica una cadena ligera variable (V_L) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**.

25. Un polinucleótido que codifica una cadena pesada variable (V_H) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**.

26. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera variable (V_L) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la **reivindicación 1**.

27. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada variable (V_H) para un anticuerpo monoclonal anti-hPG según la **reivindicación 1**.

28. Una célula huésped transformada con pares de polinucleótidos adecuada para expresar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-21**.

29. Un hibridoma capaz de secretar un anticuerpo monoclonal anti-hPG según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-21**.

30. El hibridoma de la **reivindicación 29** seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

31. El hibridoma de la **reivindicación 29**, que se selecciona del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

32. El hibridoma de la **reivindicación 29**, que se selecciona del grupo que consiste en: 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 2B4C8C8, 2B11E6G4, y 1E9A4A4.

33. Un método para obtener un anticuerpo monoclonal anti-hPG que comprende:

(a) cultivar un hibridoma de la **reivindicación 29** bajo condiciones adecuadas y

(b) recuperar el anticuerpo monoclonal anti-hPG del medio de cultivo o de las células de hibridoma.

34. Un método para tratar cáncer colorrectal que comprende administrar a un sujeto una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG humanizado neutralizante eficaz para tratar el cáncer colorrectal.

35. El método de la **reivindicación 34** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante compite para la unión con un anticuerpo monoclonal anti-hPG que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

36. El método de la **reivindicación 34** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante tiene CDR correspondientes en secuencia a las CDR de un anticuerpo monoclonal anti-hPG seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb1, anti-hPG MAb2, anti-hPG MAb3, anti-hPG MAb4, anti-hPG MAb5, anti-hPG MAb6, anti-hPG MAb7, anti-hPG MAb8, anti-hPG MAb9, anti-hPG MAb10, anti-hPG MAb11, anti-hPG MAb12, anti-hPG MAb13, anti-hPG MAb15, anti-hPG MAb16, anti-hPG MAb17, anti-hPG MAb18, anti-hPG MAb19, anti-hPG MAb20, anti-hPG MAb21, anti-hPG MAb22, o anti-hPG MAb23.

37. Un método para inhibir la proliferación de células de tumor colorrectal, que comprende exponer las células de tumor colorrectal a un anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante.

38. El método de la **reivindicación 37** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante compite para la unión con un anticuerpo monoclonal anti-hPG que se puede obtener de un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en: 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7,

1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, y 1A11F2C9.

39. El método de la **reivindicación 37** en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG neutralizante tiene CDR correspondientes en secuencia a las CDR de un anticuerpo monoclonal anti-hPG seleccionado del grupo que consiste en: anti-hPG MAb1, anti-hPG MAb2, anti-hPG MAb3, anti-hPG MAb4, anti-hPG MAb5, anti-hPG MAb6, anti-hPG MAb7, anti-hPG MAb8, anti-hPG MAb9, anti-hPG MAb10, anti-hPG MAb11, anti-hPG MAb12, anti-hPG MAb13, anti-hPG MAb15, anti-hPG MAb16, anti-hPG MAb17, anti-hPG MAb18, anti-hPG MAb19, anti-hPG MAb20, anti-hPG MAb21, anti-hPG MAb22, o anti-hPG MAb23.

40. El método de la **reivindicación 37** que se realiza *in vitro*.

41. El método de la **reivindicación 37** que se realiza *in vivo*.

42. Un kit útil para detectar hPG, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal según la **reivindicación 2** y un anticuerpo se une específicamente a una región C-terminal de hPG.

43. El kit de la **reivindicación 42**, en el que el anticuerpo que se une específicamente a una región C-terminal de hPG es un anticuerpo policlonal.

44. Un kit útil para detectar hPG, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-hPG C-terminal según la **reivindicación 9** y un anticuerpo se une específicamente a una región N-terminal de hPG.

45. El kit de la **reivindicación 44**, en el que el anticuerpo que se une específicamente a una región N-terminal de hPG es un anticuerpo policlonal.

46. Un método para diagnosticar cáncer colorrectal en un sujeto, que comprende cuantificar la cantidad de progastrina en una muestra de suero del sujeto usando al menos un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**, en el que la cantidad de progastrina en un intervalo de aproximadamente 20 a 400 pM es indicativa de cáncer colorrectal.

47. Un método para seleccionar un paciente adecuado para terapia anti-hPG, que comprende cuantificar la cantidad de progastrina en una muestra de suero de un paciente con cáncer colorrectal, usando al menos un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**, en el que una cantidad de progastrina en un intervalo de aproximadamente 20 a 400 pM es indicativa de idoneidad para terapia anti-hPG.

48. Un método para monitorizar la eficacia de un tratamiento de cáncer colorrectal, que comprende cuantificar el nivel de progastrina en sangre de un sujeto que se está tratando para cáncer colorrectal, en función del tiempo, usando al menos un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de las **reivindicaciones 1-15**, en el que una disminución dependiente del tiempo del nivel de progastrina en el suero del paciente indica que el tratamiento es eficaz.

49. Un método para inhibir una cascada de transducción de la señal dependiente de progastrina en una célula, que comprende exponer una célula que secreta hPG a una cantidad de un anticuerpo monoclonal anti-PG neutralizante eficaz para inhibir la transducción de la señal dependiente de progastrina.

ANEXO No. 3

RESUMEN Y EXTRACTO PARA PUBLICACION

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción está dirigida a anticuerpos monoclonales de progastrina, a fragmentos de éstos, a composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales de progastrina y a métodos para preparar y usar los anticuerpos monoclonales de progastrina y composiciones de éstos. La presente descripción está dirigida a métodos para tratar cáncer colorrectal con anticuerpos monoclonales de progastrina y a composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales de progastrina o fragmentos de éstos. La presente descripción está dirigida además a métodos que comprenden la detección de progastrina, incluyendo métodos para diagnosticar cáncer colorrectal y métodos para monitorizar la eficacia de terapia anti-cancerosa en sujetos que padecen cáncer colorrectal.

15984628.BUSINESS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN

☐ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☒ PCT

(21) **N° de solicitud:**	(51) **Clasificación**
(22) **Fecha de solicitud:**	(71)**Solicitante**(s) BIOREALITES S.A.S. INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
(30) **Prioridad:** (31) ***No. Prioridad*** 61/252,625 32) ***Fecha*** 16-10-2009 (33) ***País*** ESTADOS UNIDOS	(72)**Interventor**(es) PANNEQUIN Julie, BOUDIER Laure, JOUBERT Dominique y HOLLANDE Frédéric. (74) **Apoderado** (s) MARIA VICTORIA LIEBBE LOZANO

(54) **Titulo:** ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

Las casillas identificadas con 85, 86, 87 sólo aplican para PCT

(85) Fecha límite inicio fase Nacional: 16-04-2012	**(87) Publicación Internacional**
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT **Fecha de presentación de la solicitud:** 15-10-2010 **No. De Presentación:** PCT/EP2010/006329	**Fecha:** 21-04-2011 **No. Publicación:** WO 2011/045080 A2

Resumen reivindicación (es):

La presente descripción está dirigida a anticuerpos monoclonales de progastrina, a fragmentos de éstos, a composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales de progastrina y a métodos para preparar y usar los anticuerpos monoclonales de progastrina y composiciones de éstos. La presente descripción está dirigida a métodos para tratar cáncer colorrectal con anticuerpos monoclonales de progastrina y a composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales de progastrina o fragmentos de éstos. La presente descripción está dirigida además a métodos que comprenden la detección de progastrina, incluyendo métodos para diagnosticar cáncer colorrectal y métodos para monitorizar la eficacia de terapia anti-cancerosa en sujetos que padecen cáncer colorrectal.

ANEXO No. 4

INFORMACION DE LOS INVENTORES

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Los inventores son los siguientes:

Inventor / Cedente	Domicilio
Julie PANNEQUIN	13 rue Henri Barbusse 34200 Séte (Francia)
Laure BOUDIER	9 Lieu-dit Chamoiroux 03270 Busset (Francia)
Dominique JOUBERT	10 rue Gabriel Peri 34200 Séte (Francia)
Frédéric HOLLANDE	9 rue des Capries 34790 Gabrels (Francia)

ANEXO No. 5

COPIA DEL FORMULARIO DE SOLICITUD PCT EN INGLES Y ESPAÑOL

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

PCT/EP 2010 / 0 0 6 3 2 9
International Application No.

15 OCT 2010 (15. 10. 10)
International Filing Date

RO/EP
Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) N.111981

Box No. I TITLE OF INVENTION

MONOCLONAL ANTIBODIES TO PROGASTRIN AND THEIR USES

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BIOREALITES S.A.
2040 Avenue du Pere Soulas
34 000 Montpelier
France

Telephone No.

Facsimile No.

Applicant's registration No. with the Office

E-mail authorization: Marking one of the check-boxes below authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, notifications issued in respect of this international application to that e-mail address if those offices are willing to do so.

☐ as advance copies followed by paper notifications; or ☐ exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent).

E-mail address:

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

SARAH E ROQUES
J.A. KEMP & CO.
14 South Square
Gray's Inn
London
WC1R 5JJ

Telephone No.
+44 20 3077 8600

Facsimile No.
+44 20 7242 8932

Agent's registration No. with the Office

E-mail authorization: Marking one of the check-boxes below authorizes the receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority to use the e-mail address indicated in this Box to send, notifications issued in respect of this international application to that e-mail address if those offices are willing to do so.

☐ as advance copies followed by paper notifications; or ☐ exclusively in electronic form (no paper notifications will be sent).

E-mail address:

☐ **Address for correspondence:** Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

PANNEQUIN, Julie
13 rue Henri Barbusse
34200 Sete
France

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BOUDIER, Laure
Batiment 0, Appartment 69
Residence "Les Jardins du Pere Soulas"
76 Rue de St Priest
34090 Montpelier, France

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

JOUBERT, Dominique
10 rue Gabriel Peri
34200 Sete
France

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

HOLLANDE, Frederic
63 chemin de la Deridiere
34270 Les Matelles
France

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office:

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101 rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13
France

This person is:
- [X] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [X] all designated States except the United States of America
- [ ] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
Campus Gerard-Megie, 3 Rue Michel-Ange
F-75794 Paris Cedex 16
France

This person is:
- [X] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [X] all designated States except the United States of America
- [ ] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [ ] all designated States except the United States of America
- [ ] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- [ ] applicant only
- [ ] applicant and inventor
- [ ] inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of:
- [ ] all designated States
- [ ] all designated States except the United States of America
- [ ] the United States of America only
- [ ] the States indicated in the Supplemental Box

- [ ] Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos. VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No...." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:*

   (i) *if more than one person is to be indicated as applicant and/or inventor and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;*

   (ii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;*

   (iii) *if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;*

   (iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;*

   (v) *if, in Box No. VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.*

2. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition: in such case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(i) and 49bis.1(a) or (b)).*

3. *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application: in such case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(ii) and 49bis.1(d)).*

4. *If the applicant wishes to request the receiving Office or the International Bureau to obtain a priority document from a digital library but that document is only held in a digital library in connection with another application which also relied upon that priority document to support a priority claim (and unless that digital library is to be accessed through the Digital Access Service for Priority Documents), in such cases write "Continuation of Box No. VI", indicate for each earlier application concerned the same type of information as required in Box No. VI and indicate the number under which the application is stored (and, if known, the digital library concerned) (Section 716(a)(ii)).*

Continuation of Box IV

SENIOR, Alan Murray; AYERS, Martyn Lewis Stanley; WOODS, Geoffrey Corlett; SEXTON, Jane Helen; NICHOLLS, Michael John; WEBB, Andrew John; KEEN, Celia Mary; PRICE, Nigel John King; LEEMING, John Gerard; DUCKWORTH, Timothy John; MCCLUSKIE, Gail Wilson; WRIGHT, Simon Mark; SMITH, Samuel Leonard; BENSON, John Everett; CAMPBELL, Patrick John; MERRYWEATHER, Colin Henry; BENTHAM, Andrew; ROQUES, Sarah Elizabeth; SRINIVASAN, Ravi Chandran; TYSON, Robin Edward; ROBERTS, Mark Peter; TUXWORTH, Pamela Mary; JACKSON, Martin Peter; SIMONS, Amanda Louise; HOPKIN, Tobias John Buxton; POWER, David; FORD, Hazel; CURRAN, Sally Ann; RAYNOR, Stuart Andrew; CHAPMAN, Lee Phillip; GARLICK, Laura Joanna; SILCOCK, Peter James; PERKINS, Janet Frances; GREHAN, Kieron; FORSYTHE, Dominic; CHEWTER, Jennifer Alison; ROBERTS, Joanne Nicola; TURBERVILLE, Simon; O'BRIEN, Dominic Paul; LEWIS, Graham Matthew; MILTON, Christopher John; HILL, Matthew Ross of: J.A. KEMP & CO., 14 South Square, Gray's Inn, London, WC1R 5JJ, United Kingdom.

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request **constitutes under Rule 4.9(a) the designation** of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ DE Germany **is not designated** for any kind of national protection

☐ JP Japan **is not designated** for any kind of national protection

☐ KR Republic of Korea **is not designated** for any kind of national protection

(The check-boxes above may only be used to exclude (irrevocably) the designations concerned if, at the time of filing or subsequently under Rule 26bis.1, the international application contains in Box No. VI a priority claim to an earlier national application filed in the particular State concerned, in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of this earlier national application.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 16 October 2009	61/252,625	US		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

☐ The **International Bureau** is requested to obtain from a digital library, a certified copy of the earlier application(s) *(if the earlier application(s) is available to it from a digital library)* identified above as:*

☐ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

☐ The **receiving Office** is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(if the earlier application(s) was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* or to obtain a certified copy of the earlier application(s) from a digital library and transmit a copy of it to the International Bureau *(if the earlier application(s) is available to the receiving Office from a digital library)*, identified above as:*

☐ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the certified copy of the earlier application(s) is not stored in a digital library under the number of the earlier application indicated above but under the application number of another application which also claims priority from it, indicate that number in the supplemental sheet (item 4).

Restore the right of priority: the receiving Office is requested to restore the right of priority for the earlier application(s) identified above or in the Supplemental Box as item(s) (_____). *(See also the Notes to Box No. VI; further information must be provided to support a request to restore the right of priority.)*

Incorporation by reference: where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if more than one International Searching Authority is competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA/ EP

Box No. IX CHECK LIST for PAPER filings – this sheet is only to be used when filing an international application on **PAPER**

This international application **contains the following:**	Number of sheets
(a) request form PCT/RO/101 (including any declarations and supplemental sheets) :	6
(b) description (excluding any sequence listing part of the description, see (f), below) :	95 ~~98~~
(c) claims :	7 ~~8~~
(d) abstract :	1
(e) drawings (if any) :	33
(f) sequence listing part of the description (if any) :	37
Total number of sheets :	179

This international application is **accompanied by** the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item):*	Number of items
1. ☒ fee calculation sheet :	
2. ☐ original separate power of attorney :	
3. ☐ original general power of attorney :	
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number: :	
5. ☐ statement explaining lack of signature :	
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s) :	
7. ☐ Translation of international application into *(language)*: :	
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :	
9. ☒ copy in electronic form (Annex C/ST.25 text file) on physical data carrier(s) of the sequence listing, not forming part of the international application, which is **furnished only for the purposes of international search** under Rule 13*ter* *(type and number of physical data carriers)* 1 disk :	
10. ☒ a statement confirming that "the information recorded in electronic form submitted under Rule 13*ter* is identical to the sequence listing as contained in the international application" as filed on paper :	
11. ☐ copy of results of earlier search(es) (Rule 12*bis*.1(a)) :	
12. ☒ other *(specify)*: Letter :	

Figure of the drawings which should accompany the abstract:	**Language of filing** of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Sarah Roques

ROQUES, Sarah Elizabeth

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application: 15 OCT 2010 (15. 10. 10)	2. Drawings: ☒ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

PCT

PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes.

Para uso de la Oficina receptora únicamente

PCT/EP 2010 / 0 0 6 3 2 9
Solicitud internacional Nº

1 5 OCT 2010 (15. 10. 10)
Fecha de presentación internacional

RO/EP
Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud internacional PCT"

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario *(si se desea) (como máximo, 12 caracteres)* N.111981

Recuadro Nº I TÍTULO DE LA INVENCIÓN

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

Recuadro Nº II SOLICITANTE ☐ Esta persona también es inventor.

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

BIOREALITES S.A.
2040 Avenue du Pere Soulas
34 000 Montpelier
Francia

Nº de teléfono

Nº de facsímil

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Autorización a utilizar el correo-e. Al marcar una de las casillas que figuran abajo se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean

☐ como copias previas por vía electrónica seguidas de las notificaciones en papel o,

☐ por correo electrónico exclusivamente (no se enviará ninguna notificación en papel)

Dirección de correo-e:

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*: FR

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*: FR

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☒ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

Recuadro Nº III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de continuación.

Recuadro Nº IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA

La persona abajo identificada se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como: ☒ mandatario ☐ representante común

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)*

SARAH E ROQUES
J.A. KEMP & CO.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ

Nº de teléfono
+44 20 3077 8600

Nº de facsímil
+44 20 7242 8932

Nº de registro del mandatario en la Oficina

Autorización a utilizar el correo-e. Al marcar una de las casillas que figuran abajo se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar notificaciones relativas a la presente solicitud internacional, si dichas oficinas así lo desean

☐ como copias previas por vía electrónica seguidas de las notificaciones en papel o,

☐ por correo electrónico exclusivamente (no se enviará ninguna notificación en papel)

Dirección de correo-e:

☐ **Dirección para la correspondencia:** márquese esta casilla cuando no se nombre/se haya nombrado ningún mandatario o representante común y el espacio de arriba se utilice en su lugar para indicar una dirección especial a la que deba enviarse la correspondencia.

Recuadro Nº III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

PANNEQUIN, Julie
13 rue Henri Barbusse
34200 Sete
Francia

Esta persona es:
☐ solicitante únicamente
☒ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*: FR

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*: FR

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☒ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado (es decir, país) de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

BOUDIER, Laure
Batiment 0, Appartment 69
Residence "Les Jardins du Pere Soulas"
76 Rue de St Priest
34090 Montpelier, Francia

Esta persona es:
☐ solicitante únicamente
☒ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*: FR

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*: FR

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☒ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

JOUBERT, Dominique
10 rue Gabriel Peri
34200 Sete
Francia

Esta persona es:
☐ solicitante únicamente
☒ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*: FR

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*: FR

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☒ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

HOLLANDE, Frederic
63 chemin de la Deridiere
34270 Les Matelles
Francia

Esta persona es:
☐ solicitante únicamente
☒ solicitante e inventor
☐ inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*: FR

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*: FR

Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☒ los Estados Unidos de América únicamente ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.

Recuadro Nº III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101 rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13
Francia

Esta persona es:
- [X] solicitante únicamente
- [ ] solicitante e inventor
- [ ] inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*: FR

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*: FR

Esta persona es solicitante para: [ ] todos los Estados designados [X] todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América [ ] los Estados Unidos de América únicamente [ ] los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado (es decir, país) de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
Campus Gerard-Megie, 3 Rue Michel-Ange
F-75794 Paris Cedex 16
Francia

Esta persona es:
- [X] solicitante únicamente
- [ ] solicitante e inventor
- [ ] inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*: FR

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*: FR

Esta persona es solicitante para: [ ] todos los Estados designados [X] todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América [ ] los Estados Unidos de América únicamente [ ] los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

Esta persona es:
- [ ] solicitante únicamente
- [ ] solicitante e inventor
- [ ] inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*:

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*:

Esta persona es solicitante para: [ ] todos los Estados designados [ ] todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América [ ] los Estados Unidos de América únicamente [ ] los Estados indicados en el recuadro suplementario

Nombre y dirección: *(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)*

Esta persona es:
- [ ] solicitante únicamente
- [ ] solicitante e inventor
- [ ] inventor únicamente *(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)*

Nº de registro del solicitante en la Oficina

Estado de nacionalidad *(nombre del Estado)*:

Estado de domicilio *(nombre del Estado)*:

Esta persona es solicitante para: [ ] todos los Estados designados [ ] todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América [ ] los Estados Unidos de América únicamente [ ] los Estados indicados en el recuadro suplementario

[ ] Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.

Recuadro suplementario *Si no se utilizase el recuadro suplementario, no será necesario incluir esta hoja en el petitorio.*

1. Si cualquiera de los recuadros, excepto los Recuadros Nºs VIII.i) a v), para los que se incluye un recuadro de continuación especial, no bastase para contener todas las informaciones: escribir "continuación del Recuadro Nº ..." [indicar el número del recuadro] y proporcionar las informaciones según las instrucciones facilitadas en el recuadro en que el espacio era insuficiente, en particular:

*i) si hay más de una persona como **solicitante y/o inventor** y no se cuenta con una "hoja de continuación": escribir "continuación del Recuadro Nº III" y proporcionar para cada persona suplementaria el mismo tipo de informaciones que las solicitadas en el Recuadro Nº III. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado (es decir, país) de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio;*

*ii) si, en el Recuadro Nº II o en los subrecuadros del Recuadro Nº III, se ha marcado la casilla **"los Estados indicados en el recuadro suplementario"**: escribir "continuación del Recuadro Nº II o "continuación del Recuadro Nº III" o "continuación de los Recuadros Nºs II y III" (según proceda), indicar el nombre del solicitante o solicitantes en cuestión y, al lado de cada nombre, el Estado o Estados (o patente ARIPO, euroasiática, europea o de la OAPI, en su caso) para los que sea solicitante la persona mencionada;*

*iii) si, en el Recuadro Nº II o en cualquiera de los subrecuadros del Recuadro Nº III, **el inventor o el solicitante e inventor no es inventor a los fines de todos los Estados designados o de los Estados Unidos de América**: escribir "continuación del Recuadro Nº II" o "continuación del Recuadro Nº III" o "continuación de los Recuadros Nºs II y III" (según proceda); indicar el nombre del inventor o inventores y, al lado de cada nombre, el Estado o Estados (o patente ARIPO, euroasiática, europea o de la OAPI, en su caso) para los que sea inventor la persona mencionada;*

*iv) si además del mandatario o mandatarios indicados en el Recuadro Nº IV, hubiese **mandatarios adicionales**: escribir "continuación del Recuadro Nº IV" y proporcionar para cada mandatario adicional el mismo tipo de informaciones que las que se solicitan en el Recuadro Nº IV;*

*v) si, en el Recuadro Nº VI, se reivindica **la prioridad de más de tres solicitudes anteriores**: escribir "continuación del Recuadro Nº VI" y proporcionar para cada solicitud anterior suplementaria el mismo tipo de informaciones que las solicitadas en el Recuadro Nº VI.*

*2. Si el solicitante desea que su solicitud internacional sea tratada, en ciertos Estados designados, como una solicitud de patente de adición, de certificado de adición, de certificado de inventor de adición o de certificado de utilidad de adición: en este caso, escribir el nombre o el código de dos letras de cada Estado designado en cuestión acompañado de la mención **"patente de adición"**, **"certificado de adición"**, **"certificado de inventor de adición"** o **"certificado de utilidad de adición"**, el número del título principal o de la solicitud principal, así como la fecha de concesión del título principal o de presentación de la solicitud principal (Reglas 4.11.a)i) y 49bis.1.a) o b)).*

*3. Si el solicitante desea que su solicitud internacional sea tratada, en los Estados Unidos de América, como una "continuación" o "continuación en parte" de una solicitud anterior: en este caso, escribir "Estados Unidos de América" o "US" acompañado de la mención **"continuación"** o **"continuación en parte"** así como el número y la fecha de presentación de la solicitud principal (Reglas 4.11.a)ii) y 49bis.1.d)).*

4. Si el solicitante desea pedir a la Oficina receptora o a la Oficina Internacional que se procuren el documento de prioridad en una biblioteca digital, pero dicho documento solamente se halla en una biblioteca digital en relación con otra solicitud de patente que se basa en este mismo documento de prioridad para reivindicar una prioridad (a menos que se pueda acceder a la biblioteca digital por medio del servicio de acceso digital a documentos de prioridad), deberá indicar "continuación del Recuadro Nº VI", precisar para cada una de las solicitudes anteriores el tipo de información requerida en el Recuadro Nº VI, e indicar el número bajo el cual figura la solicitud (y a ser posible, de qué biblioteca digital se trata) (Instrucción 716.a)ii)).

Continuación del Recuadro Nº IV

SENIOR, Alan Murray; AYERS, Martyn Lewis Stanley; WOODS, Geoffrey Corlett; SEXTON, Jane Helen; NICHOLLS, Michael John, WEBB, Andrew John; KEEN, Celia Mary; PRICE, Nigel John King; LEEMING, John Gerard; DUCKWORTH, Timothy John; MCCLUSKIE, Gail Wilson; WRIGHT, Simon Mark; SMITH, Samuel Leonard; BENSON, John Everett; CAMPBELL, Patrick John; MERRYWEATHER, Colin Henry; BENTHAM, Andrew; ROQUES, Sarah Elizabeth; SRINIVASAN, Ravi Chandran; TYSON, Robin Edward; ROBERTS, Mark Peter; TUXWORTH, Pamela Mary; JACKSON, Martin Peter; SIMONS, Amanda Louise; HOPKIN, Tobias John Buxton; POWER, David; FORD, Hazel; CURRAN, Sally Ann; RAYNOR, Stuart Andrew; CHAPMAN, Lee Phillip; GARLICK, Laura Joanna; SILCOCK, Peter James; PERKINS, Janet Frances; GREHAN, Kieron; FORSYTHE, Dominic; CHEWTER, Jennifer Alison; ROBERTS, Joanne Nicola; TURBERVILLE, Simon; O'BRIEN, Dominic Paul; LEWIS, Graham Matthew; MILTON, Christopher John; HILL, Matthew Ross, de J.A. KEMP & CO., 14 South Square, Gray's Inn, London, WC1R 5JJ, Reino Unido.

Recuadro Nº V DESIGNACIONES

Según la Regla 4.9.a), la presentación de este petitorio **constituye la designación** de todos los Estados contratantes vinculados por el PCT en la fecha de presentación internacional a efectos de todo tipo de protección disponible y, cuando proceda, de la concesión tanto de patentes regionales como de patentes nacionales.

Sin embargo,

☐ DE Alemania **no se designa** para ningún tipo de protección nacional

☐ JP Japón **no se designa** para ningún tipo de protección nacional

☐ KR República de Corea **no se designa** para ningún tipo de protección nacional

(Se puede utilizar las casillas de arriba para excluir (de manera irrevocable) las designaciones en cuestión, a condición de que la solicitud internacional, en la fecha de presentación o ulteriormente según la Regla 26bis.1, reivindique en el Recuadro Nº VI la prioridad de una solicitud nacional anterior presentada en el Estado en cuestión, para evitar que, en virtud de la ley nacional, cesen los efectos de esta solicitud anterior).

Recuadro Nº VI REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Se reivindica la prioridad de las siguientes solicitudes anteriores:

Fecha de presentación de la solicitud anterior *(día/mes/año)*	Número de la solicitud anterior	Si la solicitud anterior es:		
		solicitud nacional: país o miembro de la OMC	solicitud regional: Oficina regional	solicitud internacional: Oficina receptora
Punto (1) 16 de octubre 2009	61/252,625	US		
Punto (2)				
Punto (3)				

☐ En el recuadro suplementario se incluyen reivindicaciones de prioridad adicionales

☐ Se pide a la **Oficina Internacional** que se procure en una biblioteca digital una copia certificada de la o las solicitudes anteriores (si la Oficina Internacional tiene acceso a esta o estas solicitudes en una biblioteca digital) indicadas abajo como*

☐ todos los puntos ☐ Punto (1) ☐ Punto (2) ☐ Punto (3) ☐ otros, ver recuadro suplementario

☐ Se pide a la **Oficina receptora** que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la o las solicitudes anteriores (si esta o estas solicitudes han sido presentadas en la Oficina que, a los fines de esta solicitud internacional, es la Oficina receptora) o que obtenga una copia certificada de la o las solicitudes anteriores en una biblioteca digital y la transmita a la Oficina Internacional (si la Oficina receptora tiene acceso a esta o estas solicitudes en una biblioteca digital), indicadas abajo, como*

☐ todos los puntos ☐ Punto (1) ☐ Punto (2) ☐ Punto (3) ☐ otros, ver recuadro suplementario

* si la copia certificada de la o las solicitudes anteriores no se halla en una biblioteca digital bajo el número de la solicitud anterior arriba indicada, sino bajo el número de otra solicitud que reivindica la misma prioridad, indicar ese número en la hoja suplementaria (Punto 4).

Restaurar el derecho de prioridad: se solicita a la Oficina receptora que restaure el derecho de prioridad respecto a la(s) solicitud(es) anterior(es) indicada(s) más arriba o en el recuadro suplementario como punto(s): (_____). *(Véanse también las Notas del Recuadro Nº VI; se darán informaciones más amplias que apoyen la petición de restauración del derecho de prioridad).*

Incorporación por referencia: cuando un elemento de la solicitud internacional mencionado en el Artículo 11.1)iii)d) o e) o una parte de la descripción, de las reivindicaciones o de los dibujos mencionada en la Regla 20.5.a) no está contenido en otro lugar en esta solicitud internacional pero figura íntegramente en una solicitud anterior cuya prioridad se reivindica en la fecha en la que uno o varios elementos mencionados en el Artículo 11.1)iii) fueron recibidos inicialmente por la Oficina receptora, ese elemento o esa parte, a reserva de confirmación según la Regla 20.6, se incorporará por referencia en esta solicitud internacional a los efectos de la Regla 20.6.

Recuadro Nº VII ADMINISTRACIÓN ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Elección de la Administración encargada de la búsqueda internacional *(si más de una Administración encargada de la búsqueda internacional es competente para efectuar la búsqueda internacional, indíquese el nombre de la Administración elegida; se puede utilizar el código de dos letras):*

ISA / EP

Recuadro Nº IX LISTA DE VERIFICACIÓN para las presentaciones en PAPEL - esta hoja se emplea exclusivamente para las solicitudes internacionales presentadas en **PAPEL**

La presente solicitud internacional **contiene lo siguiente:**	Número de hojas
a) petitorio (PCT/RO/101) (incluidas las hojas de declaración y suplementarias) ..... :	6
b) descripción (exceptuando la parte de la descripción reservada a la lista de secuencias (veáse el punto f) infra) ..... :	95
c) reivindicaciones ..... :	7
d) resumen ..... :	1
e) dibujos (en su caso) ..... :	33
f) parte de la descripción reservada a la lista de secuencias (en su caso)..... :	37
Número total de hojas: :	179

La presente solicitud internacional va **acompañada** del(los) siguiente(s) documento(s) *(marcar las casillas que procedan e indicar en la columna de la derecha el número de cada documento):*	Número de documentos
1. ☒ hoja de cálculo de tasas ..... :	
2. ☐ poder separado original ..... :	
3. ☐ poder general original ..... :	
4. ☐ copia del poder general; número de referencia: .... :	
5. ☐ declaración explicativa de la ausencia de firma ..... :	
6. ☐ documento(s) de prioridad identificado(s) en el Recuadro Nº VI como punto o puntos ..... :	
7. ☐ traducción de la solicitud internacional al *(idioma)* : ..... :	
8. ☐ indicaciones separadas relativas a microorganismos depositados o a otro material biológico ..... :	
9. ☒ copia en formato electrónico (Anexo C/ST. 25, formato texto,) con soportes lógicos de la lista de secuencias que no forma parte de la solicitud internacional, **entregada únicamente a los fines de la búsqueda internacional** en virtud de la Regla 13*ter* (indicar el tipo y el número de soportes lógicos) .1 disco..... ..... :	
10. ☒ una declaración confirmando que "la información registrada en formato electrónico en virtud de la Regla 13*ter* es idéntica a la lista de secuencias tal como se presentó en papel en la solicitud internacional" ..... :	
11. ☐ copia de los resultados de búsquedas anteriores (Regla 12*bis*.1.a)) ..... :	
12. ☒ otros *(especifíquese)*: Carta..... :	

Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen:	**Idioma de presentación** de la solicitud internacional: Inglés

Recuadro Nº X FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL MANDATARIO O DEL REPRESENTANTE COMÚN
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio).

[firma]

ROQUES, Sarah Elizabeth

Para uso de la Oficina receptora únicamente

1. Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional: 15 OCT 2010 (15. 10. 10)
2. Dibujos: ☒ recibidos: ☐ no recibidos:
3. Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior, pero dentro de plazo, de documentos o de dibujos que completen la pretendida solicitud internacional:
4. Fecha de recepción, dentro de plazo, de las correcciones requeridas según el Artículo 11.2) del PCT:
5. Administración encargada de la búsqueda internacional especificada por el solicitante: ISA /
6. ☐ Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda.

Para uso de la Oficina Internacional únicamente

Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional:

ANEXO No. 6

COPIA DE LA PUBLICACION DE LA OMPI EN INGLES

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 April 2011 (21.04.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/045080 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 16/26 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/006329

(22) International Filing Date:
15 October 2010 (15.10.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/252,625 16 October 2009 (16.10.2009) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **BIOREALITES S.A.S.** [FR/FR]; 2040 Avenue du Père Soulas, F-34 000 Montpellier (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)** [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)** [FR/FR]; Campus Gérard-Megie, 3 Rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **PANNEQUIN, Julie** [FR/FR]; 13 rue Henri Barbusse, F-34200 Sète (FR). **BOUDIER, Laure** [FR/FR]; Bâtiment A, 59, Avenue de Bellevue, 03270 Saint-Yorre (FR). **JOUBERT, Dominique** [FR/FR]; 10 rue Gabriel Peri, F-34200 Sète (FR). **HOLLANDE, Frédéric** [FR/FR]; 63 chemin de Ia Déridière, F-34270 Les Matelles (FR).

(74) Agent: **ROQUES, Sarah E.**; J.A. Kemp & Co., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES TO PROGASTRIN AND THEIR USES

(57) Abstract: The present disclosure is directed to progastrin monoclonal antibodies, fragments thereof, compositions comprising progastrin monoclonal antibodies, and methods of making and using progastrin monoclonal antibodies and compositions thereof. The present disclosure is directed to methods of treating colorectal cancer with progastrin monoclonal antibodies and compositions comprising progastrin monoclonal antibodies or fragments thereof. The present disclosure is further directed to methods comprising detection of progastrin, including methods of diagnosing colorectal cancer and methods of monitoring efficacy of anti-cancer therapy in subjects suffering from colorectal cancer.

WO 2011/045080 A2

MONOCLONAL ANTIBODIES TO PROGASTRIN AND THEIR USES

1. CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of provisional application no. 61/252,625, filed October 16, 2009, the contents of all which are incorporated herein by reference in their entirety.

2. STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH

[0002] None.

3. PARTIES TO A JOINT RESEARCH AGREEMENT

[0003] None.

4. REFERENCE TO SEQUENCE LISTING, TABLE OR COMPUTER PROGRAM

[0004] A Sequence Listing is included herewith.

5. FIELD OF INVENTION

[0005] The present disclosure is directed to, among other things, monoclonal antibodies to progastrin, compositions and methods for making such antibodies, and methods of using such antibodies, for example in the diagnosis and/or treatment of colorectal cancer.

6. BACKGROUND

[0006] Colorectal Cancer (CRC) is a major public health issue, affecting more than 1,000,000 people each year and accounting for more than 500,000 deaths each year. CRC is the second leading cause of death due to cancer. In the United States alone, for 2009, approximately 147,000 new cases and over 49,900 deaths due to CRC were reported. There are three forms of CRC: sporadic CRC; hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC), caused by germline mutations in DNA mismatch repair genes; and familial adenomatous polyposis (FAP), due to germline mutations in the APC gene. Sporadic CRC accounts for nearly 85% of cases, while HNPCC accounts for about 5% and FAP accounts for about 1% (Heyer *et al.*, 1999, Oncogene 18:5325-5333).

[0007] Clinical management of CRC typically involves surgical resection of tumors often accompanied by chemotherapy. Presently, about 50% of CRC patients die within five years of diagnosis. The lack of reliable screening tests and the ineffectiveness of

ANEXO No. 7

COPIA DE LA BUSQUEDA INTERNACIONAL EN INGLES Y ESPAÑOL

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
N.111981		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/EP2010/006329	15/10/2010	16/10/2009
Applicant		
BIOREALITES S.A.S.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [X] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/006329

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [X] in the international application as filed

   [X] together with the international application in electronic form

   [ ] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/006329

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [X] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/006329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/26 A61K39/395 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2006/032980 A1 (APHTON CORP [US]; GRIMES STEPHEN [US]) 30 March 2006 (2006-03-30) the whole document in particular, pages 3-4	1,2,7,9, 14,22, 23,29, 33,34 3-6,8, 10-13, 15-21, 24-28, 30-32, 35,36, 38,39, 42-48

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 May 2011	20/05/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Pérez-Mato, Isabel

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

136

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2007/135542 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV MONTPE) 29 November 2007 (2007-11-29) the whole document in particular, pages 13-14	1,2,7,9, 14,22, 23,34, 37,40,49 3-6,8, 10-13, 15-21, 24-28, 30-32, 35,36, 38,39, 41-48

X Y	WO 2008/076454 A1 (UNIV TEXAS [US]) 26 June 2008 (2008-06-26) the whole document in particular pages 15 and 16	34,37 35,36, 38,39,41

Y	LARRICK J W ET AL: "POLYMERASE CHAIN REACTION USING MIXED PRIMERS: CLONING OF HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY VARIABLE REGION GENES FROM SINGLE HYBRIDOMA CELLS", BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 7, 1 September 1989 (1989-09-01), pages 934-938, XP000400715, ISSN: 0733-222X, DOI: DOI:10.1038/NBT0989-934 the whole document	24-28

Y	LARRICK J W ET AL: "RAPID CLONING OF REARRANGED IMMUNOGLOBULIN GENES FROM HUMAN HYBRIDOMA CELLS USING MIXED PRIMERS AND THE POLYMERASE CHAIN REACTION", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 160, no. 3, 15 May 1989 (1989-05-15), pages 1250-1256, XP000293053, ISSN: 0006-291X the whole document	24-28

Y	TOLEIKIS L ET AL: "CLONING SINGLE-CHAIN ANTIBODY FRAGMENTS (SCFV) FROM HYBRIDOMA CELLS", METHODS IN MOLECULAR MEDICINE, HUMANA PRESS, TOTOWA, NJ, US, vol. 94, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 447-458, XP008045594, ISSN: 1543-1894 the whole document	24-28

	-/--	

International application No
PCT/EP2010/006329

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HORNBECK P ET AL: "Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)", CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, WILEY, vol. Chapter 11, 1 May 2001 (2001-05-01), page UNIT11.2, XP002477297, DOI: DOI:10.1002/0471142727.MB1102S15 the whole document	42-45

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/006329

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006032980 A1	30-03-2006	AU 2005286164 A1	30-03-2006
		CA 2580965 A1	30-03-2006
		CN 101048659 A	03-10-2007
		EP 1794586 A1	13-06-2007
		JP 2008513536 T	01-05-2008
		KR 20070100236 A	10-10-2007
WO 2007135542 A2	29-11-2007	AU 2007252986 A1	29-11-2007
		CA 2652768 A1	29-11-2007
		CN 101460196 A	17-06-2009
		EP 2040753 A2	01-04-2009
		JP 2009537627 T	29-10-2009
		US 2010209426 A1	19-08-2010
WO 2008076454 A1	26-06-2008	US 2008187577 A1	07-08-2008

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 21, 26, 27(completely); 7, 16, 22-25, 28, 29, 33(partially)

directed to monoclonal antibodies that specifically bind human progastrin, to compositions comprising these, to polynucleotides and expression vectors encoding these, to host cells transformed with said vectors, to hybridomas producing these antibodies and to methods of producing the antibodies using said hybridomas.

---

2. claims: 2, 42, 43(completely); 7, 16, 22-25, 28, 29, 33(partially)

directed to monoclonal antibodies that specifically bind an N-terminal region of human progastrin, to compositions comprising these, to polynucleotides encoding these, to host cells transformed with said polynucleotides, to hybridomas producing these antibodies, to methods of producing the antibodies using said hybridomas and to kits for detecting human progastrin using said antibodies.

---

3. claims: 3-6, 8(completely); 7, 16, 17, 19, 22-25, 28-31, 33, 35, 36, 38, 39, 46-48(partially)

directed to monoclonal antibodies that specifically bind an epitope of the N-terminal region of human progastrin consisting of SEQ ID NO:25, to compositions comprising these, to polynucleotides encoding these, to host cells transformed with said polynucleotides, to hybridomas producing these antibodies, to methods of producing the antibodies using said hybridomas and to methods to treat or diagnose colorectal cancer and to monitor treatment using said antibodies.

---

4. claims: 9, 44, 45(completely); 14, 16, 22-25, 28, 29, 33(partially)

directed to monoclonal antibodies that specifically bind an C-terminal region of human progastrin, to compositions comprising these, to polynucleotides encoding these, to host cells transformed with said polynucleotides, to hybridomas producing these antibodies, to methods of producing the antibodies using said hybridomas and to kits for detecting human progastrin using said antibodies.

---

5. claims: 10-13, 15(completely); 14, 16, 18, 20, 22-25, 28-33, 35, 36, 38, 39, 46-48(partially)

directed to monoclonal antibodies that specifically bind an epitope of the C-terminal region of human progastrin consisting of SEQ ID NO:27, to compositions comprising these, to polynucleotides encoding these, to host cells transformed with said polynucleotides, to hybridomas producing these antibodies, to methods of producing the antibodies using said hybridomas and to methods to treat or diagnose colorectal cancer and to monitor treatment using said antibodies.

---

6. claims: 34(completely); 35, 36(partially)

directed to a method of treating colorectal cancer using a humanized neutralizing anti-human progastrin antibody.

---

7. claims: 37, 40, 41(completely); 38, 39(partially)

directed to a method of inhibiting the proliferation of colorectal tumor cells using a neutralizing anti-human progastrin antibody.

---

8. claim: 49

directed to a method of inhibiting a progastrin-dependent signal transduction cascade in a cell, using a neutralizing anti-human progastrin antibody.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN	ver Formulario PCT/ISA/220 y, en su caso, el punto 5 de esta hoja.
N.111981		
Solicitud internacional Nº	Fecha de presentación internacional *(día/mes/año)*	Fecha de prioridad (la más antigua) *(día/mes/año)*
PCT/EP2010/006329	15/10/2010	16/10/2009
Solicitante		
BIOREALITES S.A.S.		

El presente informe de búsqueda internacional, elaborado por esta Administración encargada de la búsqueda internacional, se transmite al solicitante, conforme al Artículo 18. Se remite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional comprende un total de 9 hojas.

[X] Se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica citados en el informe.

1. **Base del informe**
   a. En lo que se refiere al **idioma**, la búsqueda internacional se ha realizado sobre la base de:
      [X] la solicitud en el idioma en el que se presentó
      [ ] una traducción de la solicitud al _____, que es el idioma de la traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (Reglas 12.3.a) y 23.1.b))
   b. [ ] Este informe de búsqueda internacional se ha realizado teniendo en cuenta la rectificación de un error evidente autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91(Regla 43.6*bis*. a)).
   c. [X] En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional, véase Recuadro I.
2. [ ] **Se estima que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda** (ver Recuadro II).
3. [X] **Falta unidad de invención** (ver Recuadro III).
4. Con respecto al **título**,
   [X] el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.
   [ ] el texto ha sido establecido por esta Administración con la siguiente redacción:
5. Con respecto al **resumen**,
   [X] el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.
   [ ] el texto (reproducido en el Recuadro IV) ha sido establecido por esta Administración de conformidad con la Regla 38.2). El solicitante puede presentar observaciones a esta Administración en el plazo de un mes a contar desde la fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional.
6. Con respecto a los **dibujos**,
   a. la figura de los dibujos a publicar junto con el resumen es la Figura Nº _____
      [ ] propuesta por el solicitante.
      [ ] propuesta por esta Administración, por no haber propuesto el solicitante ninguna figura.
      [ ] propuesta por esta Administración, por caracterizar mejor, esta figura, la invención.
   b. [X] no debe publicarse ninguna figura.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/EP2010/006329

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

   a. Medios

   [X] en papel

   [X] en formato electrónico

   b. Cuando

   [X] en la solicitud internacional tal y como se presentó

   [X] junto con la solicitud internacional en formato electrónico

   [ ] posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. [ ] Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº
PCT/EP2010/006329

Recuadro II **Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones Nºs:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☐ Las reivindicaciones Nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones Nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III **Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver hoja suplementaria

1. [X] Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones Nºs:

4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones Nºs:

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.

[X] El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/EP2010/006329

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
INV. C07K16/26 A61K39/395 A61P35/00
ADD.
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07K A61K A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 2006/032980 A1 (APHTON CORP [US]; GRIMES STEPHEN [US]) 30 de marzo 2006 (2006-03-30)	1,2,7,9, 14,22, 23,29, 33,34
Y	el documento completo en particular páginas 3-4	3-6,8, 10-13, 15-21, 24-28, 30-32, 35,36, 38,39, 42-48

-/--

[X] En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

[X] Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
16 de mayo 2011	20/05/2011
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Pérez-Mato, Isabel

4

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (abril 2005)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/EP2010/006329

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
X	WO 2007/135542 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV MONTPE) 29 de noviembre 2007 (2007-11-29)	1,2,7,9, 14,22, 23,34, 37,40,49
Y	el documento completo en particular páginas 13-14	3-6,8, 10-13, 15-21, 24-28, 30-32, 35,36, 38,39, 41-48
X	WO 2008/076454 A1 (UNIV TEXAS [US]) 26 de junio 2008 (2008-06-26)	34,37
Y	el documento completo en particular páginas 15 y 16	35,36, 38,39,41
Y	LARRICK J W ET AL: "POLYMERASE CHAIN REACTION USING MIXED PRIMERS: CLONING OF HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY VARIABLE REGION GENES FROM SINGLE HYBRIDOMA CELLS", BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US. vol. 7, 1 de septiembre 1989 (1989-09-01) páginas 934-938, XP000400715, ISSN: 0733-222X, DOI: DOI:10.1038/NBT0989-934 el documento completo	24-28
Y	LARRICK J W ET AL: "RAPID CLONING OF REARRANGED IMMUNOGLOBULIN GENES FROM HUMAN HYBRIDOMA CELLS USING MIXED PRIMERS AND THE POLYMERASE CHAIN REACTION", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 160, no. 3, 15 de mayo 1989 (1989-05-15) páginas 1250-1256, XP000293053, ISSN: 0006-291X el documento completo	24-28
Y	TOLEIKIS L ET AL: "CLONING SINGLE-CHAIN ANTIBODY FRAGMENTS (SCFV) FROM HYBRIDOMA CELLS", METHODS IN MOLECULAR MEDICINE, HUMANA PRESS, TOTOWA, NJ, US, vol. 94, 1 de enero 2004 (2004-01-01) páginas 447-458, XP008045594, ISSN: 1543-1894 el documento completo	24-28

-/--

4

146

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº
PCT/EP2010/006329

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
Y	HORNBECK P ET AL: "Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)", CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, WILEY, vol. Capítulo 11,1 de mayo 2001 (2001-05-01), página UNIT11.2, XP002477297, DOI: DOI:10.1002/0471142727.MB1102S15 el documento completo ----	42-45

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (abril 2005)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional Nº
PCT/EP2010/006329

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2006032980 A1	30-03-2006	AU 2005286164 A1	30-03-2006
		CA 2580965 A1	30-03-2006
		CN 101048659 A	03-10-2007
		EP 1794586 A1	13-06-2007
		JP 2008513536 T	01-05-2008
		KR 20070100236 A	10-10-2007
WO 2007135542 A2	29-11-2007	AU 2007252986 A1	29-11-2007
		CA 2652768 A1	29-11-2007
		CN 101460196 A	17-06-2009
		EP 2040753 A2	01-04-2009
		JP 2009537627 T	29-10-2009
		US 2010209426 A1	19-08-2010
WO 2008076454 A1	26-06-2008	US 2008187577 A1	07-08-2008

INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional como sigue:

1. reivindicaciones: 1, 21, 26, 27 (completamente); 7, 16, 22-25, 28, 29, 33 (parcialmente)

   dirigidas a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la progastrina humana, a composiciones que comprenden éstos, a polinucleótidos y vectores de expresión que codifican éstos, a células huésped transformadas con dichos vectores, a hibridomas que producen estos anticuerpos y a métodos para producir los anticuerpos usando dichos hibridomas.

   - - -

2. reivindicaciones: 2, 42, 43 (completamente); 7, 16, 22-25, 28, 29, 33 (parcialmente)

   dirigidas a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a una región N-terminal de la progastrina humana, a composiciones que comprenden éstos, a polinucleótidos que codifican éstos, a células huésped transformadas con dichos polinucleótidos, a hibridomas que producen estos anticuerpos, a métodos para producir los anticuerpos usando dichos hibridomas y a kits para detectar progastrina humana usando dichos anticuerpos.

   - - -

3. reivindicaciones: 3-6, 8 (completamente); 7, 16, 17, 19, 22-25, 28-31, 33, 35, 36, 38, 39, 46-48 (parcialmente)

   dirigidas a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un epítopo de la región N-terminal de la progastrina humana que consiste en SEQ ID NO: 25, a composiciones que comprenden éstos, a polinucleótidos que codifican éstos, a células huésped transformadas con dichos polinucleótidos, a hibridomas que producen estos anticuerpos, a métodos para producir los anticuerpos usando dichos hibridomas y a métodos para tratar o diagnosticar cáncer colorrectal y para monitorizar el tratamiento usando dichos anticuerpos.

   - - -

4. reivindicaciones: 9, 44, 45 (completamente); 14, 16, 22-25, 28, 29, 33 (parcialmente)

   dirigidas a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a una región C-terminal de la progastrina humana, a composiciones que comprenden éstos, a polinucleótidos que codifican éstos, a células huésped transformadas con dichos polinucleótidos, a hibridomas que producen estos anticuerpos, a métodos para producir los anticuerpos usando dichos hibridomas y a kits para detectar progastrina humana usando dichos anticuerpos.

   - - -

5. reivindicaciones: 10-13, 15 (completamente); 14, 16, 18, 20, 22-25, 28-33, 35, 36, 38, 39, 46-48 (parcialmente)

INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210

dirigidas a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un epítopo de la región C-terminal de la progastrina humana que consiste en SEQ ID NO: 27, a composiciones que comprenden éstos, a polinucleótidos que codifican éstos, a células huésped transformadas con dichos polinucleótidos, a hibridomas que producen estos anticuerpos, a métodos para producir los anticuerpos usando dichos hibridomas y a métodos para tratar o diagnosticar cáncer colorrectal y para monitorizar el tratamiento usando dichos anticuerpos.

- - -

6. reivindicaciones: 34 (completamente); 35, 36 (parcialmente)

dirigidas a un método para tratar cáncer colorrectal usando un anticuerpo anti-progastrina humana humanizado neutralizante.

- - -

7. reivindicaciones: 37, 40, 41 (completamente); 38, 39 (parcialmente)

dirigidas a un método para inhibir la proliferación de células de tumor colorrectal usando un anticuerpo anti-progastrina humana neutralizante.

- - -

8. reivindicación: 49

dirigida a un método para inhibir una cascada de transducción de la señal dependiente de progastrina en una célula, usando un anticuerpo anti-progastrina humana neutralizante.

- - -

ANEXO No. 8

OTROS DOCUMENTOS OMPI EN INGLES Y ESPAÑOL

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2011/045080
PCT/EP2010/006329

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

ROQUES, Sarah E.
J.A. Kemp & Co.
14 South Square,
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)* 19 May 2011 (19.05.2011)		
Applicant's or agent's file reference N.111981	IMPORTANT NOTICE	
International application No. PCT/EP2010/006329	International filing date *(day/month/year)* 15 October 2010 (15.10.2010)	Priority date *(day/month/year)* 16 October 2009 (16.10.2009)
Applicant BIOREALITES S.A.S. et al		

1. **ATTENTION**: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
21 April 2011 (21.04.2011)

   None

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93*bis*.1 :

   LU, TZ, UG

   In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

   For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS** from the priority date.

   In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

   It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Yolaine Cussac

e-mail: pt05.pct@wipo.int

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

WO 2011/045080
PCT/EP2010/006329

Emisor : la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

PRIMERA NOTIFICACIÓN INFORMANDO AL SOLICITANTE DE LA COMUNICACIÓN DE LA SOLICITUD INTERNACIONAL(A LAS OFICINAS DESIGNADAS A LAS QUE NO APLICA EL PLAZO DE 30 MESES SEGÚN EL ARTÍCULO 22.1)

(regla 47.1.c) del PCT)

Destinatario :

ROQUES, Sarah E.
J.A. Kemp & Co.
14 South Square,
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
REINO UNIDO

Fecha de emisión *(día/mes/año)* 19 de mayo 2011 (19.05.2011)		
Referencia del expediente del solicitante o del representante N.111981	**NOTIFICACIÓN IMPORTANTE**	
Solicitud internacional nº PCT/EP2010/006329	Fecha de la solicitud internacional *(día/mes/año)* 15 de octubre de 2010 (15.10.2010)	Fecha de prioridad *(día/mes/año)* 16 de octubre de 2009 (16.10.2009)
Solicitante BIOREALITES S.A.S. et al.		

1. **ATENCIÓN**: Para cualquier oficina designada a la que **aplique** el plazo según el artículo 22.1) tal como está en vigor desde el 1 de abril de 2002 (30 meses a contar desde la fecha de prioridad), se ruega referirse al formulario PCT/IB/308(Segunda notificación suplementaria) (que se emitirá en un breve plazo después de expirar el plazo de 28 meses a contar desde la fecha de prioridad).

2. Por la presente se notifica que la oficina o las oficinas designadas siguientes – a las que **no aplica** el plazo según el artículo 22.1) tal como está en vigor desde el 1 de abril de 2002 – han solicitado que la comunicación de la solicitud internacional, prevista en el artículo 20, se efectúe conforme a la regla *93bis*.1. La Oficina internacional ha dirigido esta comunicación en la fecha indicada a continuación:
21 de abril de 2011 (21.04.2011)

   Ninguna

   Conforme a la regla 47.1.c-*bis*)i), estas oficinas aceptarán la presente notificación como prueba determinante del hecho de que se ha efectuado correctamente la comunicación de la solicitud internacional en la fecha de emisión indicada anteriormente y no se exigirá al solicitante que proporcione una copia de la solicitud internacional a la oficina o a las oficinas designadas.

3. Las siguientes oficinas designadas, a las que **no aplica** el plazo según el artículo 22.1) tal como está en vigor desde el 1 de abril de 2002, no han solicitado, en la fecha de emisión de la presente notificación, que se efectúe la comunicación de la solicitud internacional conforme a la regla 93*bis*.1:

   LU, TZ, UG

   Conforme a la regla 47.1.c-*bis*)ii), estas oficinas aceptarán la presente notificación como prueba determinante del hecho de que el Estado contratante para el que esta oficina actúa como oficina designada no exige al solicitante que proporcione una copia de la solicitud internacional en virtud del artículo 22.

4. **PLAZO para el comienzo de la fase nacional**

   Para la o las oficinas designadas anteriormente mencionadas y a menos que se haya presentado una solicitud de examen preliminar internacional antes de que expire el plazo de **19 meses** a contar desde la fecha de prioridad (véase el artículo 39.1), el plazo aplicable para el comienzo de la fase nacional será, **con la salvedad de lo que se dice en el párrafo siguiente,** de **20 MESES** a contar desde la fecha de prioridad.

   En la práctica, continuarán aplicándose **los plazos distintos de aquel de 20 meses,** con duraciones diversas, en lo que se refiere a algunas oficinas designadas mencionadas anteriormente. Para obtener **las actualizaciones regulares relativas a los plazos aplicables** (20 ó 21 meses, u otro plazo), oficina por oficina, se ruega referirse a la *Gaceta del PCT*, al boletín *PCT Newsletter*, así como a los capítulos nacionales pertinentes en el volumen II de la *Guía del Solicitante del PCT*, accesibles en la página de Internet de la OMPI en la siguiente dirección: http://www.wipo.int/pct/fr/index.html.

   El solicitante es el **único responsable** de respetar todos los plazos contemplados anteriormente.

Oficina internacional de la OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Ginebra 20, Suiza no de fax +41 22 338 82 70	Funcionario autorizado Yolaine Cussac Correo electrónico: pt05.pct@wipo.int

Formulario PCT/IB/308(Primera notificación) (enero 2004)

WO 2011/045080
PCT/EP2010/006329

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

ROQUES, Sarah E.
J.A. Kemp & Co.
14 South Square,
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*	
16 February 2012 (16.02.2012)	
Applicant's or agent's file reference: N.111981	**IMPORTANT NOTICE**
International application No.: PCT/EP2010/006329	International filing date *(day/month/year)*: 15 October 2010 (15.10.2010)
Priority date *(day/month/year)*: 16 October 2009 (16.10.2009)	
Applicant: BIOREALITES S.A.S. et al	

1. **ATTENTION**: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93*bis*.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
21 April 2011 (21.04.2011)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93*bis*.1 :

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CL, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PE, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TH, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-*bis*)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS for entry into the national phase**

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph,** be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Yolaine Cussac

e-mail: pt05.pct@wipo.int

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

WO 2011/045080
PCT/EP2010/006329

Emisor : la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

SEGUNDA NOTIFICACIÓN INFORMANDO AL SOLICITANTE DE LA COMUNICACIÓN DE LA COMUNICACÓN DE LA SOLICITUD INTERNACIONAL (A LAS OFICINAS DESIGNADAS A LAS QUE APLICA EL PLAZO DE 30 MESES SEGÚN EL ARTÍCULO 22.1)

(regla 47.1.c) del PCT)

Destinatario :

ROQUES, Sarah E.
J.A. Kemp & Co.
14 South Square,
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
REINO UNIDO

Fecha de emisión *(día/mes/año)* 16 de febrero 2012 (16.02.2012)		
Referencia del expediente del solicitante o del representante N.111981	**NOTIFICACIÓN IMPORTANTE**	
Solicitud internacional nº PCT/EP2010/006329	Fecha de la solicitud internacional *(día/mes/año)* 15 de octubre de 2010 (15.10.2010)	Fecha de prioridad *(día/mes/año)* 16 de octubre de 2009 (16.10.2009)
Solicitante BIOREALITES S.A.S. et al.		

1. **ATENCIÓN**: Para cualquier oficina designada a la que **no aplique** el plazo según el artículo 22.1) tal como está en vigor desde el 1 de abril de 2002 (30 meses a contar desde la fecha de prioridad), se ruega referirse al formulario PCT/IB/308(Primera notificación) emitida anteriormente.

2. Por la presente se notifica que la oficina o las oficinas designadas siguientes – a las que **aplica** el plazo según el artículo 22.1) tal como está en vigor desde el 1 de abril de 2002 – han solicitado que la comunicación de la solicitud internacional, prevista en el artículo 20, se efectúe conforme a la regla *93bis*.1. La Oficina internacional ha dirigido esta comunicación en la fecha indicada a continuación:
21 de abril de 2010 (21.04.2010)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

Conforme a la regla 47.1.c-*bis*)i), estas oficinas aceptarán la presente notificación como prueba determinante del hecho de que se ha efectuado correctamente la comunicación de la solicitud internacional en la fecha de emisión indicada anteriormente y no se exigirá al solicitante que proporcione una copia de la solicitud internacional a la oficina o a las oficinas designadas.

3. Las siguientes oficinas designadas, a las que **aplica** el plazo según el artículo 22.1) tal como está en vigor desde el 1 de abril de 2002, no han solicitado, en la fecha de emisión de la presente notificación, que se efectúe la comunicación de la solicitud internacional conforme a la regla 93*bis*.1:

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CL, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PE, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TH, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Conforme a la regla 47.1.c-*bis*)ii), estas oficinas aceptarán la presente notificación como prueba determinante del hecho de que el Estado contratante para el que esta oficina actúa como oficina designada no exige al solicitante que proporcione una copia de la solicitud internacional en virtud del artículo 22.

4. **PLAZO para el comienzo de la fase nacional**
Para la o las oficinas designadas o elegidas anteriormente mencionadas el plazo aplicable para el comienzo de la fase nacional será, **con la salvedad de lo que se dice en el párrafo siguiente,** de **30 MESES** a contar desde la fecha de prioridad.

En la práctica, continuarán aplicándose **los plazos distintos de aquel de 30 meses**, con duraciones diversas, en lo que se refiere a algunas oficinas designadas o elegidas mencionadas anteriormente. Para obtener **las actualizaciones regulares relativas a los plazos aplicables** (30 ó 31 meses, u otro plazo), oficina por oficina, se ruega referirse a la *Gaceta del PCT*, al boletín *PCT Newsletter*, así como a los capítulos nacionales pertinentes en el volumen II de la *Guía del Solicitante del PCT*, accesibles en la página de Internet de la OMPI en la siguiente dirección: http://www.wipo.int/pct/fr/index.html.

El solicitante es el **único responsable** de respetar todos los plazos contemplados anteriormente.

Oficina internacional de la OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Ginebra 20, Suiza no de fax +41 22 338 82 70	Funcionario autorizado Yolaine Cussac Correo electrónico: pt05.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY PCT/EP2010/006329

Reçu le

13 MARS 2012

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

ROQUES, Sarah E.
J.A. Kemp & Co.
14 South Square,
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
08 March 2012 (08.03.2012)

Applicant's or agent's file reference
N.111981

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/EP2010/006329

International filing date *(day/month/year)*
15 October 2010 (15.10.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

BOUDIER, Laure
Bâtiment A
59, Avenue de Bellevue
03270 Saint-Yorre
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BOUDIER, Laure
Lieu-dit Chamoiroux
F-03270 Busset
France

State of Nationality: FR
State of Residence: FR
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Authorized officer

Gaspais Stephane

e-mail pt05.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 05

ANEXO No. 9

COMPROBANTES DE PAGO DE TASA OFICIAL POR SOLICITUD DE PCT + 39 REIVINDICACIONES ADICIONALES

ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A PROGASTRINA Y SUS USOS

BIOREALITES, INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE y CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033772

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

158

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033773

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033774

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033775

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033776

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

162

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033777

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033778

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

164

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033779

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

==========

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033780

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033781

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

167

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033782

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033783

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____ 1
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033784

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

170

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033785

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

==========

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033786

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

172

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033787

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

173

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033788

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

174

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033789

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

175

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033790

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033791

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033792

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033793

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033794

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

180

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033795

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033796

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033797

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

==========

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

183

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033798

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033799

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033800

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033801

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033802

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033803

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

109

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033804

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

190

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033805

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

191

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033806

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
- -
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

192

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033807

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

193

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033808

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-**-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033809

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

195

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033810

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060147- -00000-0000
Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

196

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0033811

Bogotá D.C., Abril 09 de 2012 - 12:19:18

RECIBIDO DE : ESTRATEGIA JURIDICA NACIONAL E INTERNACIONAL LTDA. NI 830.042.424

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427153414	09/04/2012	1.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	30.000.00
				$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

197

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

ADMI

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-060147- -00000-0000

Fecha: 2012-04-12 15:51:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 197

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☑ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐