



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 474**

51 Int. Cl.:
A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/595 (2006.01)
C07K 16/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97905858 .3**
96 Fecha de presentación : **07.02.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0889735**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.1999**

54 Título: **Procedimientos inmunológicos para el tratamiento del cáncer gastrointestinal.**

30 Prioridad: **08.02.1996 US 11411 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.06.2011

73 Titular/es: **CANCER ADVANCES, Inc.**
4364 South Alston Avenue
Durham, North Carolina, US

72 Inventor/es: **Gevas, Philip, C.;**
Karr, Stephen, L.;
Grimes, Stephen;
Michaeli, Dov y
Watson, Susan, A.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos inmunológicos para el tratamiento del cáncer gastrointestinal

5 Antecedentes de la invención

La hormona gastrina madura se produce en dos formas moleculares que se nombran en relación con el número de aminoácidos en el péptido, es decir tetratriacontagastrina (G34) y heptadecagastrina (G17). En las células productoras de gastrina, estas hormonas gastrina se procesan después de la traducción a partir de una molécula precursora común denominada "preprogastrina", que contiene un péptido señal. El péptido señal "pre" se elimina en el retículo endoplásmico de la célula, lo que da como resultado el péptido "progastrina", que, a su vez, se procesa adicionalmente en la célula para dar las gastrinas maduras G34 y G17 antes de su secreción a la corriente sanguínea (Dickinson 1991). (Las citas completas de las referencias mencionadas en el presente documento se proporcionan en la sección Referencias anterior a las Reivindicaciones). Las formas maduras de G34 y G17 están, las dos, amidadas (NH₂) en su extremo carboxi terminal. Se ha dilucidado que hay múltiples formas de G17 resultantes del procesamiento diferencial de la molécula precursora, cada una de las cuales puede tener actividades biológicas diferentes (Dickinson 1995 y Ciccotosto y col. 1995). Actualmente, la hormona gastrina es un factor de crecimiento bien reconocido para los adenocarcinomas colorrectales humanos (véase Watson y col. 1993, para una revisión). Los pacientes con cáncer colorrectal presentan niveles plasmáticos elevados de gastrina total, y, en particular, se han detectado mayores cantidades del precursor de la hormona, progastrina, en muchos tumores colorrectales usando antisuero frente a gastrina (Ciccotosto y col. 1995).

En general, en tumores como los presentes en el cáncer de colon dependiente de gastrina, las células cancerosas pierden la capacidad de procesar prohormonas hasta el final debido a los defectos en las vías reguladoras de la secreción de hormonas. Esto conduce a la producción y secreción de diferentes formas moleculares de la hormona. Las células de carcinoma de colon no procesan de forma eficiente la progastrina y, por tanto, producen principalmente gastrinas incompletas o aberrantes, lo que da lugar a menos conversión del precursor de la gastrina en los péptidos maduros (Dickinson 1993 y Rehfeld y col. 1993). El incremento de los niveles de gastrina en los tumores colorrectales se atribuye, en parte, a la expresión aberrante del gen de la gastrina en las células de tumores colorrectales (Hoosein y col. 1990, Baldwin y col. 1992 y Finley y col. 1993). Se han identificado péptidos similares a la gastrina en dichas células (Hoosein y col. 1988, Watson y col. 1991 y Finley y col. 1993) y se confirmó que eran especies precursoras de la gastrina (Van-Solinge y col. 1993 y Nemeth y col. 1993).

La G17 asociada con el suero tiene el potencial de estimular el crecimiento de tumores colorrectales de un modo endocrino mediado por los receptores de CCKB/gastrina (Watson y col. 1993). La gastrina-17 parece estar particularmente involucrada en la estimulación del crecimiento de adenocarcinomas colorrectales humanos debido a una posible afinidad mayor por los receptores de gastrina/coleistoquinina (CCK) B sobre las células tumorales, con respecto a la otra especie de hormona gastrina (Rehfeld, J.F. 1972). Se ha descubierto que los receptores de CCKB/gastrina se expresan en una forma de alta afinidad sobre el 56,7% de los tumores colorrectales primarios humanos (Upp y col. 1989). Se ha postulado que también puede existir un potencial bucle autocrino debido a la producción endógena de los péptidos precursores de gastrina por parte de dichos tumores (Van-Solinge y col. 1993 y Nemeth y col. 1993), dado que recientemente se ha demostrado que la molécula precursora de la gastrina, gastrina 17 extendida con glicina (G17-Gly) estimulaba el crecimiento de una línea de células tumorales gastrointestinales. Se ha demostrado que los efectos tróficos de la G17-Gly sobre los tumores están mediados por un receptor distinto al receptor de CCKB/gastrina y se ha postulado que un bucle de crecimiento autocrino, que posiblemente implique a los precursores de la gastrina, está involucrado en la proliferación de tumores gastrointestinales (Seva y col. 1994).

Los tratamientos disponibles para los tumores estimulados o inducidos por la gastrina y para los tumores que producen gastrina consisten en, principalmente, la resección quirúrgica del tejido canceroso. Con frecuencia, este enfoque no tiene éxito; en muchos casos, no pueden localizarse los tumores o están en puntos anatómicos inoperables. En la mayoría de los casos, estos tumores no responden bien a los regímenes de radio o quimioterapia, y se necesitan nuevos tratamientos para complementar los presentes procedimientos.

Se han descrito numerosos antagonistas del receptor de CCKB/gastrina de alta afinidad, tales como L-365,260 (Bock y col. 1989) y CI-988 (Hughes y col. 1990), que se ha demostrado que neutralizan de forma eficaz los efectos de la gastrina exógena sobre el crecimiento del tumor gastrointestinal tanto *in vitro* como *in vivo* (Watson y col. y Romani y col., 1994). No obstante, los antagonistas carecen de especificidad, ya que bloquean las acciones de todos los ligandos potenciales del receptor, como la gastrina-34 (G34) y la CCK. Además, los receptores celulares que reconocen y se unen al precursor de la gastrina, G17-Gly, no se unen a todos los inhibidores analizados (Seva y col. 1994). Por tanto, si un receptor distinto está implicado en la cascada de crecimiento autocrino, los antagonistas de la gastrina pueden ser útiles para bloquear este mecanismo de estimulación del crecimiento tumoral.

Un procedimiento terapéutico de neutralizar inmunológicamente de forma selectiva la actividad biológica de la hormona gastrina proporcionaría un medio eficaz de controlar o prevenir los cambios patológicos resultantes del exceso de producción de gastrina.

Las patentes de EE.UU. números 5.023.077 y 5.468.494 divulgan composiciones inmunógenas útiles para controlar los niveles de G17 y de G34 en un paciente a través de la generación de anticuerpos anti-gastrina y el uso de dichas composiciones para el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales y tipos de cáncer inducidos por gastrina..

La composición inmunógena de la patente de EE.UU. 5.023.077 para inmunización activa toma la forma de un péptido conjugado que comprende

- (1) un fragmento de gastrina-17 que consiste en los primeros n aminoácidos N-terminales, en el que n es de 4 a 12, especialmente de 4 a 8,
- (2) un vehículo inmunógeno, preferentemente el toxoide diftérico, y, opcionalmente
- (3) un péptido espaciador unido al extremo C terminal del fragmento a través del cual el fragmento de gastrina 17 está conjugado al vehículo. El espaciador puede ser, por ejemplo, Lys Arg Pro Pro Pro Lys, proporcionando las lisinas entrecruzamiento.

La patente de EE.UU. anterior menciona anticuerpos del fragmento definido anteriormente para inmunización pasiva.

La patente europea EP-B 380,230 es similar.

La patente de EE.UU.5.468.494 se refiere a dos péptidos conjugados específicos del tipo anterior en los que n es 9 y el péptido está conjugado al vehículo a través de un espaciador Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys o Arg Pro Pro Pro Pro Cys.

Watson, SA y col., Anti-Gastrin antibodies raised by Gastrimmune inhibit growth of the human colorectal tumor AP5, Int. J. Cancer, 61: 233-240, 1995, describen la producción de antisuero en conejos contra gastrina, un inmunógeno construido a partir de la porción N-terminal de la G17 humana conjugada con el toxoide diftérico y que este antisuero bloqueaba el crecimiento basal in vitro de la línea celular de tumores colorrectales humanos AP5.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de un inmunógeno anti-gastrina-17 en la fabricación de una formulación para tratar tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que:

- el inmunógeno comprende un péptido amino-terminal de gastrina-17 conjugado con un vehículo inmunógeno mediante un péptido espaciador, en el que el péptido amino-terminal de la gastrina-17 comprende los aminoácidos 1 a 9 de la gastrina-17 y los aminoácidos 1 a 9 son la secuencia pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu; y
- el inmunógeno induce un título suficiente de anticuerpos anti-gastrina 17 para neutralizar la gastrina-17 amidada y la gastrina-17 extendida con glicina.

También se proporciona el uso de un anticuerpo anti-gastrina-17 en la fabricación de un medicamento para tratar tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que el anticuerpo neutraliza la gastrina-17 amidada y la gastrina-17 extendida con glicina.

Adicionalmente, se proporciona un inmunógeno anti-gastrina-17 para usar en el tratamiento de tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que:

- el inmunógeno comprende un péptido amino-terminal de gastrina-17 conjugado con un vehículo inmunógeno mediante un péptido espaciador, en el que el péptido amino-terminal de la gastrina-17 comprende los aminoácidos 1 a 9 de la gastrina-17 y los aminoácidos 1 a 9 son la secuencia pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu; y
- el inmunógeno induce un título suficiente de anticuerpos anti-gastrina 17 para neutralizar la gastrina-17 amidada y la gastrina-17 extendida con glicina.

También se proporciona adicionalmente un anticuerpo anti-gastrina-17 para usar en el tratamiento de tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que el anticuerpo neutraliza la gastrina-17 amidada y la gastrina-17 extendida con glicina.

También se describen procedimientos inmunológicos para el tratamiento de tumores dependientes de gastrina que comprenden la inmunización activa o pasiva de un paciente con el inmunógeno anti-G17 o con anticuerpos contra la hormona gastrina 17 con el fin de controlar los niveles de gastrina 17 extendida con glicina y amidada del paciente. Induciendo anticuerpos anti-gastrina 17 en un paciente humano, la hormona gastrina 17 y la prohormona progastrina G17-Gly se neutralizan in vivo, de forma que se inhiben sus efectos fisiológicos. En particular, la neutralización de G17 y del precursor G17-Gly previene la unión de estos péptidos a sus receptores fisiológicos, de modo que inhibe el crecimiento de las células tumorales.

Los inmunógenos anti-G17 comprenden fragmentos de los aminoácidos N-terminales de G17 conjugados a un vehículo inmunógeno tal como el toxoide diftérico (TD), mediante un péptido espaciador, y producen anticuerpos que se unen a las formas tanto amidada como extendida con glicina de G17.

Se ha descrito que el procedimiento de inmunización contra la G17 amidada o extendida con glicina puede comprender, preferentemente, inmunización activa, en la que un paciente es inmunizado con un inmunógeno de la invención. El inmunógeno estimula la producción de anticuerpos contra la G17 amidada y extendida con glicina en el paciente inmunizado, induciendo suficientes títulos de anticuerpos para neutralizar e inhibir los efectos fisiológicos de la G17 amidada y extendida con glicina para limitar los niveles de hormona trófica cancerosa producida por el paciente.

La neutralización fisiológica de la hormona progastrina G17-Gly por parte los anticuerpos anti-G17 producidos en el paciente inhibe las células tumorales dependientes de progastrina G17-Gly como el estimulador o inductor del crecimiento. Los procedimientos de tratamiento de la invención están particularmente adaptados para el tratamiento de cánceres gastrointestinales respondedores a G17-Gly o G17-amidada.

Los inmunógenos de la invención comprenden péptidos compuestos por dos regiones funcionales: una región inmunomimética y una región espaciadora. La función de la región inmunomimética que sufre reacción cruzada inmunológicamente con G17 y G17-Gly es inducir anticuerpos en el animal inmunizado que se unen a la hormona G17 a la que están dirigidos, es decir G17 amidada y extendida con glicina, de modo que inhiben la función de G17 y detienen o ralentizan el crecimiento de las células tumorales dependientes de G17. Los presentes inmunógenos inducen una respuesta inmunitaria biológicamente eficaz tras la administración del inmunógeno en todos los animales inmunizados analizados. El péptido inmunomimético-espaciador de la presente invención se puede acoplar a vehículos inmunológicos en un amplio intervalo de proporciones de sustitución entre el péptido y el transportador y dan un inmunógeno eficaz.

También se describe que el procedimiento de tratamiento puede comprender inmunización pasiva, en la que los anticuerpos contra G17 se administran al paciente en una concentración suficiente para reducir los niveles de G17 no unida en circulación y de G17-Gly. Los reducidos niveles de G17 libre y de progastrina en la sangre en circulación de un paciente como resultado de la administración de anticuerpos anti-G17 tienen como resultado una inhibición del crecimiento y del tamaño de los tumores. Se prefiere que los anticuerpos anti-G17 para terapia humana puedan ser anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos, que se pueden producir mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Descripción breve de las figuras

La **Figura 1** es una representación en diagrama de G17-extendida con glicina, G17 carboxi-amidada y un inmunógeno anti-G17 (péptido conjugado) que contiene una porción amino terminal de G17.

La **Figura 2** es una representación gráfica del desplazamiento de [¹²⁵I]G17 de antisuero de conejo anti-G17 (1-9):TD humana (específico de N-terseinal) por G17, G17 extendida con glicina y G34.

La **Figura 3** es una representación gráfica del desplazamiento de [¹²⁵I]G17 de antisuero de conejo anti G17 humana (específico de N-terainal) por G17, G17 extendida con glicina y G34.

La **Figura 4** representa un gráfico de barras del efecto de las inmunizaciones con los inmunógenos usados en la invención sobre la mediana de las áreas transversales de los tumores DHDK12. (Los intervalos intercuartílicos para cada mediana están en la parte superior de las respectivas columnas).

La **Figura 5** representa un gráfico de barras del efecto de las inmunizaciones con los inmunógenos usados en la invención sobre la mediana de los pesos finales de los tumores DHDK12 (los intervalos intercuartílicos para cada mediana están en la parte superior de las respectivas columnas).

La **Figura 6** representa los niveles de anticuerpos anti-G17 de rata de ratas individuales inmunizadas con G17 (1-9) y con TD (medidos a una dilución de 1:100 del suero).

- 1 En la exposición del tumor (tratamiento con G17 (1-9) de rata, 5)
- 2 Al finalizar la terapia (tratamiento con G17 (1-9) de rata, 7 inmunizaciones)
- 3 En la exposición del tumor (tratamiento con TD, 5 inmunizaciones)
- 4 En la terminación de la terapia (tratamiento con TD, 7 inmunizaciones)
- 5 Control positivo (antisuero de rata anti-G17:TD de rata)
- 6 Control negativo (suero de rata normal)

Los niveles de anticuerpos se midieron mediante un ensayo de captura ELISA en el que los anticuerpos anti-G17:TD de rata se unieron a G17-BSA de rata en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. La unión del anticuerpo se detectó usando un procedimiento basado en la fosfatasa alcalina con pNPP como sustrato.

Descripción detallada de la invención

Los procedimientos descritos están dirigidos a la administración a un paciente de un inmunógeno anti-G17 que induce anticuerpos en el paciente inmunizado que se unen y neutralizan la G17 amidada y la G17 extendida con glicina (véase la Figura 1).

Sorprendentemente, los inmunógenos y las composiciones inmunógenas contra G17 divulgadas en las patentes de EE.UU. co-asignadas nº 5.023.077 y 5.468.494 también producen anticuerpos en animales inmunizados que reaccionan con, y neutralizan, gastrina 17 amidada y gastrina 17 extendida con glicina. Por tanto, de forma ventajosa, estos inmunógenos pueden usarse en procedimientos de tratamiento de estados de enfermedades cancerosas que son tróficas debido a estas hormonas precursoras.

Las patentes de EE.UU. números 5.023.077 y 5.468.494 divulgan composiciones que contienen inmunógenos anti-gastrina 17 y procedimientos de uso de estas composiciones para el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales y de cánceres inducidos por gastrina. La presente invención se refiere al uso de los mismos inmunógenos anti-G17 para tratar estados de enfermedad tales como cánceres gastrointestinales que están afectados por la prohormona G17-Gly.

En la presente invención, se puede analizar una muestra de suero del paciente que tenga cáncer gastrointestinal para determinar el nivel de G17-Gly en la sangre del paciente. Una dosificación eficaz que varía de 0,001 a 2 mg de la composición inmunógena se administra al paciente para el tratamiento del cáncer gastrointestinal. La dosificación eficaz de la composición inmunógena debería ser capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un paciente de niveles eficaces del título de anticuerpos contra gastrina 17 humana y la G17-Gly en 1-3 meses tras la inmunización. Tras la inmunización de un paciente, los niveles del título de anticuerpos contra G17 amidada o extendida con Gly se monitorizan en una muestra de sangre tomada del paciente y se administrarán inmunizaciones de refuerzo según se requiera para mantener un título de anticuerpos eficaz que neutralice la G17-Gly y la G17 amidada. El título eficaz de anticuerpos que neutralizarán la G17-Gly y la G17 amidada se define como la capacidad mínima de unión al antígeno de 5 picomoles de antígeno unido en un mililitro del suero del paciente, medido mediante ensayos inmunológicos convencionales. Además, el suero G17-Gly se puede monitorizar para evaluar la eficacia de la inmunización contra G17. El tratamiento eficaz de los cánceres gastrointestinales, tales como adenocarcinomas colorrectales, de acuerdo con este procedimiento, debería tener como resultado la inhibición del crecimiento del tumor y una disminución del tamaño del tumor.

Los títulos de anticuerpo producidos por los inmunógenos superan los requeridos para neutralizar la G17 en suero, lo que tiene como resultado niveles séricos elevados de anticuerpos que no están formando complejos y que están en forma libre para unirse a G17-Gly. Por tanto, los anticuerpos "libres" asociados con el suero estarían disponibles para neutralizar los péptidos de G17 asociados con las células en las áreas bien vascularizadas de los tumores.

Los anticuerpos producidos por los inmunógenos usados en la presente invención pueden tener significativos efectos anti-tróficos contra el cáncer gastrointestinal, tales como un tumor de colon, mediante dos potenciales mecanismos: (i) neutralización de la G17 en suero y (ii) neutralización de las moléculas de G17-Gly asociadas con las células.

Los ejemplos siguientes demuestran el efecto de la inmunización activa con el inmunógeno de G17 de rata sobre el crecimiento in vivo de la línea de cáncer de colon de rata, DHDK12. La DHDK12 es una línea celular de tumor de colon de rata de morfología epitelial (Martin y col. 1983). El inmunógeno analizado está compuesto por los 9 aminoácidos N-terminales de G17 unidos al TD mediante un péptido espaciador y puede fabricarse de modo que sea específico de G17 humana o de rata. El antisuero producido mediante inmunización con anti-G17 se denomina anti-G17(1-9):TD y contiene un péptido espaciador.

Ejemplo 1

Estos experimentos demuestran que el inmunógeno induce antisueros que se unen a G17 amidada y G17 extendida con glicina, pero no a G34.

Especificidad de gastrina del antisuero producido mediante inmunización con anti-G17 de conejos

Los antisueros se absorbieron sobre una fase sólida a una concentración de 100 µg/ml y el desplazamiento se determinó en un ensayo competitivo con una concentración fija de G17 radiomarcada (1000 µg/ml) y concentraciones crecientes de ligandos sin marcar (1-25.000 µg/ml).

Las Figuras 2 y 3 muestran el desplazamiento de [¹²⁵I]G17 de antisuero de anti-G17 humana de conejo por G17, G17-Gly y G34. El antisuero usado en el ensayo representado en la Figura 2 se obtuvo de animales inmunizados con G17(1-9):TD y era específico del extremo N-terminal de G17; el antisuero de la Figura 3 era específico del extremo C-terminal de G17. La G17 desplazó la G17 radiomarcada de ambas preparaciones de antisueros con una concentración de inhibición del 50% (CI₅₀) de 3500 pg/ml para la anti-G17(1-9):TD (N-terminal) humana de conejo y de 800 pg/ml para la anti-G17 (C-terminal) de conejo. La G17 extendida con glicina no desplazó la G17 radiomarcada del antisuero específico C-terminal, pero sí lo hizo del antisuero N-terminal específico (CI₂₅ 12.000 pg/ml), lo que demuestra que la G17 extendida con glicina se une al antisuero específico N-terminal pero no al anticuerpo específico C-terminal. La G34 desplazó la G17 radiomarcada del extremo C (CI₂₅ 500 pg/ml), pero no el antisuero específico N-terminal, lo que demuestra la especificidad del antisuero G17(1-9):TD para G17 y G17 extendida con glicina y no para G34.

Ejemplo 2

Estos experimentos muestran que las células colónicas de rata DHDK12 producen gastrina 17 extendida con glicina y que el antisuero anti-G17 reduce los niveles de la misma producida por las células.

Radioinmunoensayo de los niveles de gastrina extendida con glicina y amidada

Se cultivaron las células DHDK12 hasta la sub-confluencia en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Irvine, Escocia, Reino Unido) suplementado con glutamina 2 mM (Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido) y 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (FCS, Sigma). Las células se incubaron en condiciones húmedas a 37°C con 5% de CO₂. Las células se recolectaron con de EDTA al 0,025% (15 minutos a 37°C), se lavaron mediante centrifugación y se sembraron 2x10⁶ células en matraces que contenían medio sin suero (RPMI 1640 en una proporción de 1:1 con Hams F12 (Gibco) con 0,5% de seroalbúmina bovina [BSA]). Las células se recolectaron con EDTA al 0,025%, se lavaron, se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril y se calentaron en un baño de agua en ebullición. Los niveles de gastrina extendida con glicina y amidada se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) usando los anticuerpos 109-21 y L-2, respectivamente, como se ha descrito (Nemeth y col., 1993).

En dos experimentos separados se demostró que las células DHDK12 contenían gastrina extendida con glicina, pero no G17 amidada, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de gastrina extendida con glicina y amidada asociados con las células DHDK12

	Conc. de G17 extendida con glicina (fmol/10 ⁷ células)	Conc. de G17 amidada (fmol/10 ⁷ células)
Experimento 1 (1,0 x 10 ⁷ células/ml)	31,2	ND ¹
Experimento 2 (1,27 x 10 ⁷ células/ml)	80,0	ND ¹
Los extractos de células tumorales se prepararon calentando las células en 1 ml de agua estéril. Los extractos celulares se recuperaron mediante centrifugación y los niveles de gastrina extendida con glicina y G17 amidada se midieron usando los anticuerpos 109-21 y L-2, respectivamente, como se ha descrito anteriormente (Nemeth y col., 1993).		
¹ ND - No detectado		

Efecto del tratamiento con anti-G17:TD de conejo sobre los niveles de gastrina extendida con glicina y amidada de las células DHDK12

Se prepararon monocapas de células DHDK12 semi-confluentes como se ha descrito anteriormente en medio sin suero y se recogieron con EDTA al 0,025%. Después, a los matraces se añadieron anti-G17:TD de conejo de afinidad/purificada y anti-TD de conejo (control negativo) a concentraciones de la proteína equivalentes para dar una capacidad de unión al antígeno para la primera de 3 ng/ml. Las células se incubaron durante 4 días, tras los cuales se prepararon los extractos celulares y se evaluaron para determinar los niveles de gastrina extendida con glicina y amidada tal como se ha descrito con anterioridad, mostrándose los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2. Niveles de gastrina extendida con glicina y amidada de las células DHDK12 tras tratamiento in vitro con antisuero anti-G17 (1-9):TD de conejo

Tratamiento	Conc. de G17 extendida con glicina (fmol/10 ⁷ células)	Conc. de G17 amidada (fmol/10 ⁷ células)
Antisuero anti-G17 (1-9):TD de conejo	ND	ND
Antisuero anti-DT de conejo	67,0	ND ¹
Se cultivaron células DHDK12 en medio sin suero (RPMI 1640 en una proporción de 1:1 con Hams F12 con 0,5% de seroalbúmina bovina). Después, al matraz se añadieron anti-G17 (1-9):TD de conejo de afinidad/purificada y anti-TD de conejo a una concentración de la proteína de 3 ng/ml y se incubaron durante 4 días. Los extractos celulares se recuperaron mediante centrifugación y los niveles de gastrina extendida con glicina y G17 amidada se midieron usando los anticuerpos 109-21 y L-2, respectivamente, como se ha descrito anteriormente (Nemeth y col., 1993).		
¹ ND - No detectado		

Como se puede ver en la Tabla 2, el antisuero de conejo anti-G17:TD de rata redujo los niveles de G17 extendida con glicina de 67 pg/ml a indetectables.

También se demostró que las células DHDK12 expresaban G17 extendida con glicina asociada con las células pero no gastrina amidada. !!! El tratamiento in vitro de las células DHDK12 con anti-G17 (1-9):TD de rata de conejo redujo los niveles de la G17 extendida con glicina asociada con las células cuando se comparó con las células tratadas con antisuero control anti-TD de conejo. Por tanto, los anticuerpos producidos mediante inmunización con anti-G17 pueden interrumpir un bucle de crecimiento autocrino en el que participan dichos péptidos como consecuencia de la disminución de la traducción de la gastrina.

Ejemplo 3

Los experimentos siguientes demuestran que la inmunización de ratas con el inmunógeno G17 (1-9) TD de rata inhibe considerablemente el crecimiento de tumores DHDK12 in vivo.

Animales experimentales

Ratas BDIX macho (The Animal Units, University of Liverpool, Reino Unido) de 6-20 semanas de edad y de 340-430 g de peso se estabularon por parejas y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a a 25°C con una humedad del 50%.

Se dejó que las ratas se aclimataran durante al menos 7 días antes de usar.

Procedimiento de inmunización

La G17 (1-9) de rata acoplada con TD o el componente de TD solo se disolvieron en solución salina estéril (0,9%), a pH 7,3 a 1 mg/ml. Se añadió el dipéptido nor-muranilo (nor-MDP, , Peninsula Labs, CA) como adyuvante del conjugado para dar una concentración final de 500 µg/ml. La solución acuosa se mezcló con aceite (Montanide ISA 703 AMS Seppic, Inc., París, Francia) en una proporción de 1:1 (vol:vol) y se introdujo en una jeringuilla de cristal que estaba fijada a una segunda jeringuilla con una válvula de tres vías como conector y la mezcla de introdujo y extrajo en la jeringuilla 100 veces (la válvula produjo una cizalladura en ángulo recto para ayudar en la emulsificación).

Los animales control recibieron una emulsión idéntica que contenía sólo el péptido TD y todos los grupos experimentales se igualaron con respecto al peso. Un volumen de 200 µl de la emulsión se inyectó por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho del animal de experimentación. Los animales recibieron la inmunización a intervalos de 21 días y el tumor se implantó tras 5 inmunizaciones.

Iniciación del crecimiento del tumor

Se suspendieron células DHDK12 en solución salina estéril al 0,9% a una concentración de $2,5 \times 10^7$ células/ml. Se anestesió a las ratas mediante una inyección de 1 ml de Hypnorm (citrato de fentanilo 0,315 ng/ml y Fluanisone 10 mg/ml, Janssen, Bélgica), Hypnovel (midazolam 5 ng/ml, Roche, Suiza) y agua destilada estéril en una proporción de 1:1:5. Después de una incisión s.c. en el flanco derecho se inyectó un volumen de 200 µl de la suspensión celular en la capa muscular de la pared abdominal y se cerró la incisión quirúrgica con una grapa quirúrgica. Cada grupo experimental estaba constituido por entre 16 y 18 ratas.

Efecto de la inmunización con anti-G₁₇ de rata sobre el crecimiento in vivo de tumores DHDK12

Las Figuras 4 y 5 muestran el efecto de la inmunización con el inmunógeno de rata G17(1-9)-TD (5 inmunizaciones antes de la inyección de células) sobre las áreas transversales y los pesos finales, respectivamente, de los tumores DHDK12. Los tumores presentaban áreas transversales significativamente reducidas en las ratas inmunizadas con el inmunógeno anti-G17. La Figura 4 ilustra datos que muestran la reducción de la mediana de las áreas transversales de los tumores de ratas tratadas con anti-G17 en un 70,2% en comparación con los tumores de los controles TD, $p = 0,005$, prueba de Mann Whitney. Los tumores DHDK12 también presentaban pesos tumorales significativamente reducidos en las ratas inmunizadas con el inmunógeno anti-G17. La Figura 5 muestra que los pesos de los tumores DHDK12 se habían reducido en un 56,5% en comparación con los tumores de los controles TD, $p = 0,0078$. El peso medio de los animales en las ratas tratadas con anti-G17 aumentó de 399 g a 452 g (incremento del 13%) durante el experimento y en los animales tratados con TD de 392 a 447 g (incremento del 13,8%), lo que indica que la tasa de crecimiento de los animales no estaba afectada por la administración del inmunógeno G17 (1-9)-TD.

Ejemplo 4

Los experimentos muestran los niveles de anticuerpos anti-G17 de rata inducidos en ratas inmunizadas en las que se implantó el tumor DHDK12.

Niveles de anticuerpos anti-G17 de rata en ratas inmunizadas con G17 (1-9):TD

Para determinar la respuesta de anticuerpos al inmunógeno emulsionado G17(1-9):TD de rata, se extrajo sangre de la cola de las ratas en varios puntos de tiempo y se usó la técnica de ELISA para determinar los títulos de anticuerpos anti-G17:TD de rata.

Se preparó un conjugado de G17-BSA de rata a una concentración de 2 µg/ml en tampón de glicina (0,1M, pH 9,5) y se sembraron 25 µl por pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos Immunolon (Dynatech Labs., Sussex, Reino Unido) y se incubaron durante la noche a 4°C. Después, el conjugado no absorbido se eliminó mediante sacudidas y los pocillos se lavaron en tampón constituido por solución salina al 0,9%, pH 7,3, que contiene 0,5% de Tween-20 (Sigma) y 0,02% de NaN₃ (Sigma). Este tampón se usó para las diluciones de lavado y de reactivo. Los sueros para analizar (de los animales inmunizados con el inmunógeno gastrina de rata) se usaron a una dilución inicial de 1:100 y, después, a diluciones por 10. El control positivo fue antisuero anti-G17 de rata, de animales previamente inmunizados, y los controles negativos fueron sueros de ratas normales y sueros de ratas inmunizadas con TD. Estos se usaron a las mismas diluciones que se han descrito para los sueros a analizar. Los sueros control y de análisis se añadieron a los pocillos a volúmenes de 25 µl, bien en ausencia o bien en presencia de 25 µl/pocillo de G17-BSA de rata a 100 µg/ml (los pocillos control recibieron 25 µl de tampón de ensayo). Después, las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con tampón salino, después, se añadió a los pocillos Ig de cabra anti-rata (H + L)-botina (Zymed, San Francisco, CA) a una dilución de 1:500, 50 µl/pocillo y se incubaron durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con tampón salino y se añadió a los pocillos fosfatasa alcalina con avidina (Zymed) a una dilución de 1:100, 50 µl/pocillo y se incubaron durante 60 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón salino se añadió a los pocillos sustrato de p-nitro-fenilfosfato (pNPP) (Sigma) en tampón sustrato a 50 µl/pocillo y, transcurrido un tiempo de desarrollo de 5 minutos, se leyó la absorbancia a 405 nm. La diferencia en la absorbancia entre los sueros no tratados y los sueros co-incubados con G17-BSA de rata se calculó como la absorbancia específica.

Se midieron los niveles de anticuerpos anti-G17 (1-9):TD de rata libres (el exceso de los anticuerpos requeridos para unirse a la G17 asociada con el suero) y se expresaron como la absorbancia específica obtenida a una dilución de 1:100 de suero (Figura 6). Tras 5 inmunizaciones, en el momento de la inyección de las células tumorales, el nivel medio de anticuerpos era 0,243 unidades de absorbancia (Grupo 1 de la Figura 6). El nivel medio de anticuerpos había aumentado, al finalizar el estudio, tras 2 inmunizaciones adicionales, a 0,66 unidades de absorbancia (Grupo 2 de la Figura 6) y estaba en el intervalo de los controles positivos (Grupo 3 de la Figura 6). Los niveles de anticuerpos de animales inmunizados con TD tenían una absorbancia media de 0,1 unidades (Grupos 4 y 5 de la Figura 6) y el control negativo (suero de ratas normales) no mostró absorbancia alguna (Grupo 6 de la Figura 6). No se observó ninguna correlación evidente entre el peso del tumor y los niveles de anticuerpos medidos mediante análisis de regresión lineal ($p = 0,14$).

Ejemplo 5

Los experimentos siguientes muestran que la inmunización contra G17 reducía los niveles séricos de G17 y que estos niveles menores se correlacionaban con una reducción del crecimiento del tumor

Niveles de G17 en ratas inmunizadas determinados mediante un RIA de inhibición

Placas de microtitulación de 96 pocillos fueron revestidas con antisuero anti-G17 de conejo (específico de C-terminal, Dakopatts, Bucks., Reino Unido) a una concentración de la proteína de 10 ng/pocillo en PBS. Se construyó una curva estándar incubando [¹²⁵I]G17 a una concentración fija de 10.000 CPM/pocillo con concentraciones crecientes de G17.

Las muestras desconocidas que contenían gastrina libre, G17 unida y anticuerpos anti-G17 libres y unidos se prepararon en alícuotas de 250 µl. A cada muestra de suero se añadió un alícuota de 125 µl de suero de ternero neonato (Sigma) y 312,5 µl de polietilenglicol al 25% (Sigma). Éstos se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 1500 rpm durante 30 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se sometió a ebullición (para garantizar la ausencia de anticuerpos libres) y se clasificó como la muestra de gastrina libre.

El sedimento se lavó 5 veces en tampón veronal 0,002M (pH 8,4) que contenía 0,5% de seroalbúmina bovina y se solubilizó mediante ebullición en 250 µl de agua. Ésta se clasificó como la muestra que contenía gastrina unida. A la G17 marcada se añadieron por triplicado alícuotas de cada una de las muestras y se determinó el nivel de inhibición. Los niveles de gastrina en los sueros de rata se calcularon después a partir de la curva estándar.

Se descubrió que el nivel de gastrina libre en suero (medido con un antisuero dirigido contra el extremo carboxi de G17) de las ratas inmunizadas con TD era de 114,0 pg/ml (desviación típica de 31) en comparación con 68,5 pg/ml (desviación típica de 20) en el grupo inmunizado con G17 (1-9):TD de rata. Esto corresponde a una reducción del 40% de la gastrina total. Los niveles de gastrina sérica total se correlacionaron con el peso final del tumor y se descubrió que el coeficiente de correlación era estadísticamente significativo, ($p = 0,011$, análisis de regresión lineal).

Se descubrió que los niveles de gastrina en suero unida a los anticuerpos era cero en las ratas inmunizadas con TD y varió de 30,1 a 253,7 pg/ml en ratas inmunizadas con G17 (1-9):TD de rata (mediana de 53,3 pg/ml).

Las células de tumor de colon de rata DHDK12 en crecimiento in vivo, en virtud de sus receptores de CCKB/gastrina, han respondido a la G17 sérica. En estos experimentos, el exceso de anticuerpos anti-G17 (es decir, los no unidos a la G17 sérica) se midió durante la exposición del tumor. Se demostró que los niveles de gastrina sérica total se habían reducido en un 40% y se demostró una correlación positiva significativa entre el peso del tumor y los niveles de gastrina sérica al finalizar la terapia. Además, también se detectó gastrina unida a anticuerpos en las ratas inmunizadas con G17 (1-9):TD, pero no en las ratas inmunizadas con TD. Por tanto, la neutralización de la gastrina asociada con el suero contribuyó a la reducción del crecimiento tumoral.

Ejemplo 6

Los experimentos muestran que la inmunización contra G17 afecta al aspecto histológico de los tumores DHDK12.

Evaluación histológica de los tumores de rata

Al finalizar la terapia, los tumores DHDK12 se fijaron en calcio formal y se embebieron en parafina. Con un criostato se cortaron secciones de 5 μ m, se tiñeron con hematoxilina y eosina, y un anatomopatólogo independiente evaluó los parámetros patológicos de los tumores. Se realizó un análisis por imagen enmascarado de las secciones tumorales usando un Seescan Image Analyzer para evaluar el área de tejido tumoral viable.

Los receptores de gastrina (RF) se detectaron usando un anticuerpo policlonal anti receptores de CCKB/gastrina de conejo. Las secciones se incubaron con una dilución de 1:500 durante la noche a 4°C. La unión se detectó usando la técnica de avidina-biotina con inmunoperoxidasa como indicador enzimático y diaminobencidina como sustrato.

La evaluación histológica reveló que los tumores de ratas inmunizadas con G17(1-9):TD de rata tenían un aro menor de tejido tumoral viable alrededor del borde principal del tumor y un mayor grado de necrosis central en comparación con los tumores de ratas inmunizadas con TD. Esto se cuantificó mediante análisis por imagen y el porcentaje medio de área de células viables en los tumores de ratas tratadas con G17(1-9):TD de rata fue 40,3% (desviación típica de 9,1) en comparación con 58,6% (Desviación típica de 10,4) para las ratas inmunizadas con TD ($p= 0,003$, prueba de t de student).

La microscopia de gran aumento mostró que las células tumorales en las ratas inmunizadas con TD crecían de forma trabecular regular, mientras que las células tumorales de ratas inmunizadas con G17(1-9):TD presentaban un patrón de crecimiento alterado. Asimismo, había más tejido conjuntivo en los tumores de ratas tratadas con G17(1-9):TD en comparación con los tumores de ratas inmunizadas con TD (siendo la proporción tejido conjuntivo:tumor 75:25 y 50:50, respectivamente). Había áreas de necrosis focal dentro del tejido tumoral viable en el grupo tratado con G17(1-9):TD y, también, un incremento del infiltrado inflamatorio que parecía estar compuesto principalmente por linfocitos. Los tumores de ratas de ambos grupos de tratamiento de tiñeron con antisero anti-GR y se demostró que las células viables restantes en los grupos tratados con TD y con G17(1-9):TD habían conservado su positividad para RG.

La inmunización con el inmunógeno G17:TD reduce el crecimiento in vivo de los tumores de colon de rata DHDK12 como se muestra mediante las mediciones del área transversal y el peso. La extrapolación de la evaluación cuantitativa del tejido tumoral viable mediante análisis por imagen indicó que el peso del tejido tumoral viable puede haberse reducido tanto como un 68%.

Otro hallazgo adicional fue el área focal de necrosis dentro del tejido tumoral en ratas tratadas con anti-G17 y la presencia de un infiltrado inflamatorio en ciertas zonas del tumor compuesto principalmente por linfocitos. Una posible explicación de dichos hallazgos es que el inmunógeno anti-G17 indujo una respuesta citotóxica celular dependiente de anticuerpos. El mecanismo de tal respuesta aplicado a la inmunización contra G17 se desconoce.

La inmunización anti-G17 tuvo como resultado la posible neutralización de dos formas tróficas, G17 y G17 extendida con glicina, y, por tanto, puede inducir citoestasis dentro de los tumores. Las observaciones histológicas proporcionan pruebas de la teoría de que los tumores de ratas tratadas con el inmunógeno anti-G17 tienen una tasa de crecimiento más lento que los tumores procedentes de las ratas control, ya que el patrón de crecimiento, el grado de fibrosis y el área del tejido tumoral viable se redujeron significativamente en las primeras ratas. Es interesante el hecho de que las células tumorales viables restantes mostraban un mantenimiento de su expresión de RG. Esto indica que en este modelo tumoral, el fenotipo sensible a la hormona gastrina puede haberse expresado en todos los clones celulares y no se produjo sobrecrecimiento de clones no sensibles a la hormona gastrina que condujeran a escape de la inhibición inmunogénica con anti-G17-

Ejemplo 7

Evaluación inmunocitoquímica de la expresión de receptores de CCXB/gastrina de células DHDK12

5 Células DHDK12 se suspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml y volúmenes de 200 μ l se citocentrifugaron en portaobjetos de microscopio (1200 rpm, 5 minutos). Las células se fijaron con metanol a -20°C (5 minutos) y se permeabilizaron mediante tratamiento con alcoholes graduados. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-receptor de CCKB/gastrina de conejo y se tiñeron como se ha descrito anteriormente.

10 La expresión de receptores de CCKB/gastrina de las células DHDK12 se evaluó con antisuero producido contra las secuencias peptídicas derivadas del receptor de CCKB/gastrina humano. Las células DHDK12 mostraron una fuerte inmunorreactividad específica asociada a la membrana indicativa de un nivel elevado de expresión de receptores de gastrina. Las células tratadas con un antisuero control de conejo no mostraron inmunorreactividad específica.

15 Referencias

1. Watson, S.A. y Steele, R.J.C. Gastrin receptors in GI tumors. R.G. Landes, Austin, 1993.
2. Rehfeld, J.F. Three components of gastrin in human serum. *Biochim. Biophys. Acta.*, 285: 364-372, 1972.
3. Upp, J.R., Singh, S., Townsend, C.M. y Thompson, J.C. Clinical significance of gastrin receptors in human colon cancers. *Cancer Res.*, 49: 488-492, 1989.
4. Hoosein, N.M., Kiener, P.A., Curry, R.C. y Brattain, M.G. Evidence for autocrine growth stimulation of cultured colon tumor cells by a gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Exptl. Cell Res.*, 186: 15-21, 1990.
5. Baldwin, G.S. y Zhang, Q-X. Measurement of gastrin and transforming growth factor a messenger RNA levels in colonic carcinoma cell lines by quantitative polymerase chain reaction. *Cancer Res.*, 52: 2261-2267, 1992.
6. Finley, G.G., Koski, R.A., Melham, M.F., Pipas, J.M. y Meisler, A.1. Expression of the gastrin gene in the normal human colon and colorectal adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 53: 2919-2926, 1993.
7. Watson, SA, Durrant, L.G., Wencyk, P.M., Watson, A.L. y Morris, D.L. Intracellular gastrin in human gastrointestinal tumor cells. *J.N.C.I.*, 83: 866-872, 1991.
8. Hoosein, N.M., Kiener, P.A. y Curry, R.C. Anti-proliferative effects of gastrin receptor antagonists and antibodies to gastrin on human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 48: 7179-7183, 1988.
9. Van-Solin go, WW., Nielsen, P.C., Friis-Hansen, L., Falkmer, U.G. y Rehfeld, J.F. Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas. *Gastroenterology*, 104:1099-1107, 1993.
10. Nemeth, J., Taylor, B., Pauwels, S., Varro A. y Dockray, G.J. Identification of progastrin derived peptides in colorectal carcinoma extracts. *Gut.*, 34: 90-95, 1993.
11. Seva, C., Dickinson, C.J. y Yamada, 1. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin. *Science*, 265: 410-412, 1994.
12. Bock, M.G., DiPardio, R.M., Evans, B.E., Rittle, K.E., Whitter, A., Veber, D, Anderson, E. y Freidinger, A. Benzodiazepine, gastrin and brain cholecystokinin receptor ligands: L-365,260. *J. Med. Chem.*, 32: 13-17, 1989.
13. Hughes, J., Boden, P., Costall, B., Domeney, A., Kelly, E., Horwell, D.C., Hunter, J.C., Pinnock, RD. y Woodruff, G.N. Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 6728-6732, 1990.
14. Watson, SA, Durrant, L.G., Elston, P. y Morris, D.L. Inhibitory effects of the gastrin receptor antagonist (L365,260) on gastrointestinal tumor cells. *Cancer*, 68: 1255-1260, 1991.
15. Romani, R., Howes, L.G. y Morris, D.L. Potent new family of gastrin receptor antagonists (GRAs) produces in vitro and in vivo inhibition of human colorectal cancer cell lines. *Procs. AACR*, 35: 397 (abstract), 1994.
16. Makishimi, R., Larkin, P., Michaeli, D. y Gaginella, T.S. Active immunization against gastrin-17 with an N-terminal derived immunogen inhibits gastric and duodenal lesions in rats. *Gastroent.*, 106: A824, 1994.
17. Martin, F., Caignard, A., Jeannin, J-F., Leclerc, A. y Martin, M. Selection of trypsin of 2 sublines of rat colon cancer cells forming progressive or regressive tumors. *Int. J. Cancer*, 32: 623-627, 1983.

18. Ohning, G.V., Wong, H.C. y Walsh, J.H. Differential kinetics for immunoneutralization of circulating gastrin by gastrin monoclonal antibody and its Fab, fragment in rats. *Peptides*, 15: 417-423, 1994.

19. Dickinson, C.J. Relationship of gastrin processing to colon cancer. *Gastroenterology*, 109: 1384-1388, 1995.

20 Ciccotosto, GD., McLeish, A., Hardy, K.J. y Shulkes, A. Expression, processing, and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma. *Gastroenterology*, 109: 1142-1153, 1995.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inmunógeno anti-gastrina-17 en la fabricación de una formulación para tratar tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que:

el inmunógeno comprende un péptido amino-terminal de gastrina-17 conjugado con un vehículo inmunógeno mediante un péptido espaciador, en el que el péptido amino-terminal de la gastrina-17 comprende los aminoácidos 1 a 9 de la gastrina-17 y los aminoácidos 1 a 9 son la secuencia pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu; y el inmunógeno induce suficiente título de anticuerpos anti-gastrina 17 para neutralizar la gastrina-17 amidada y la gastrina 17 extendida con glicina.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que el transportador inmunógeno es la toxina diftérica.

3. Uso de un anticuerpo anti-gastrina-17 en la fabricación de un medicamento para tratar tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que el anticuerpo neutraliza la gastrina-17 amidada y la gastrina-17 extendida con glicina.

4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el tumor gastrointestinal es un tumor colorrectal.

5. Un inmunógeno anti-gastrina-17 para usar en el tratamiento de tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que:

el inmunógeno comprende un péptido amino-terminal de gastrina-17 conjugado con un vehículo inmunógeno mediante un péptido espaciador, en el que el péptido amino-terminal de la gastrina-17 comprende los aminoácidos 1 a 9 de la gastrina-17 y los aminoácidos 1 a 9 son la secuencia pGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu; y el inmunógeno induce suficiente título de anticuerpos anti-gastrina 17 para neutralizar gastrina-17 amidada y gastrina 17 extendida con glicina.

6. El inmunógeno de la reivindicación 5, en el que el transportador inmunógeno es la toxina diftérica.

7. El inmunógeno de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en el que el tumor gastrointestinal es un tumor colorrectal.

8. Un anticuerpo anti-gastrina-17 para usar en el tratamiento de tumores gastrointestinales de mamífero dependientes de gastrina-17 extendida con glicina, en el que el anticuerpo neutraliza la gastrina-17 amidada y la gastrina-17 extendida con glicina.

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el tumor gastrointestinal es un tumor colorrectal.

FIG. 1

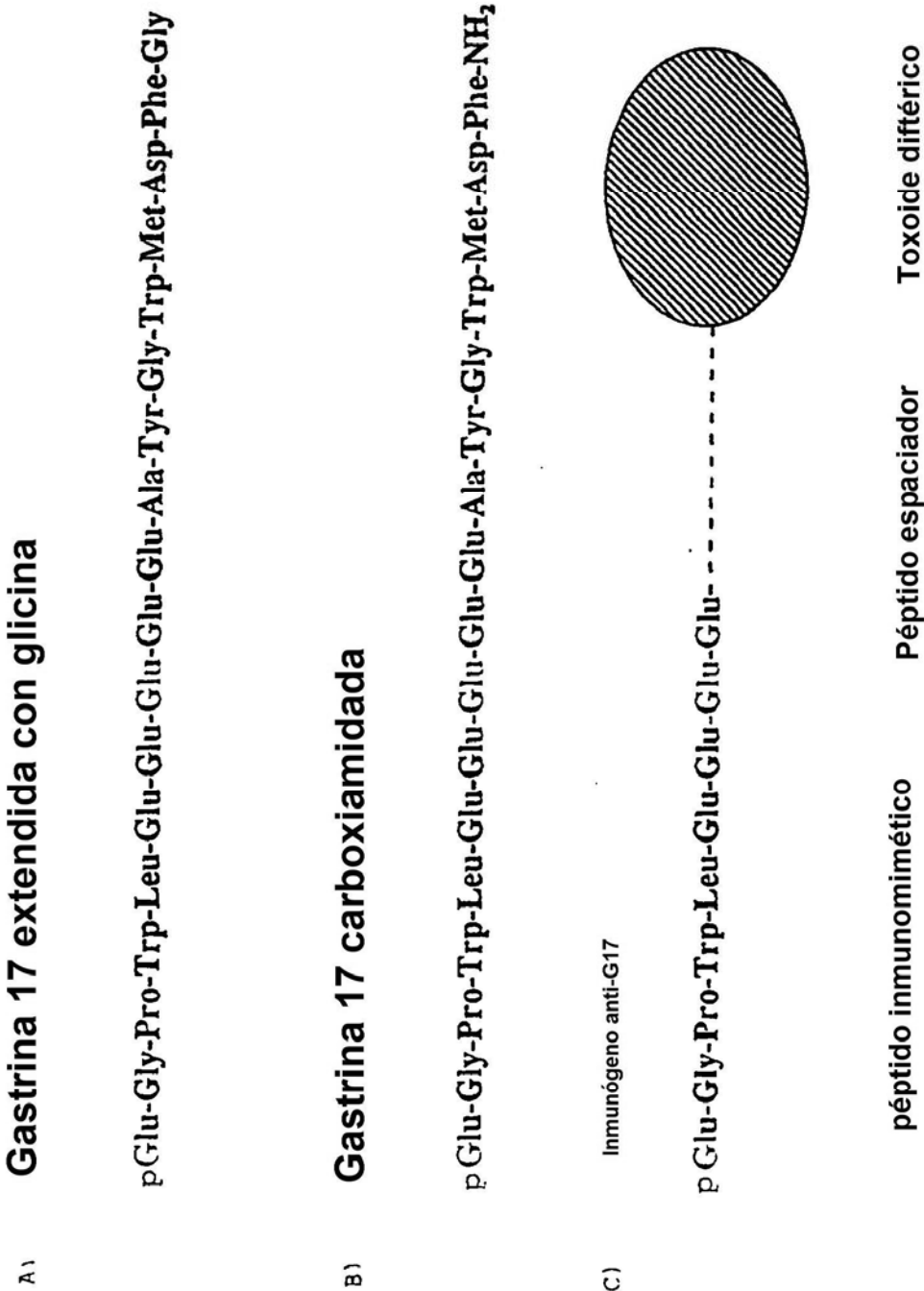


FIG. 2

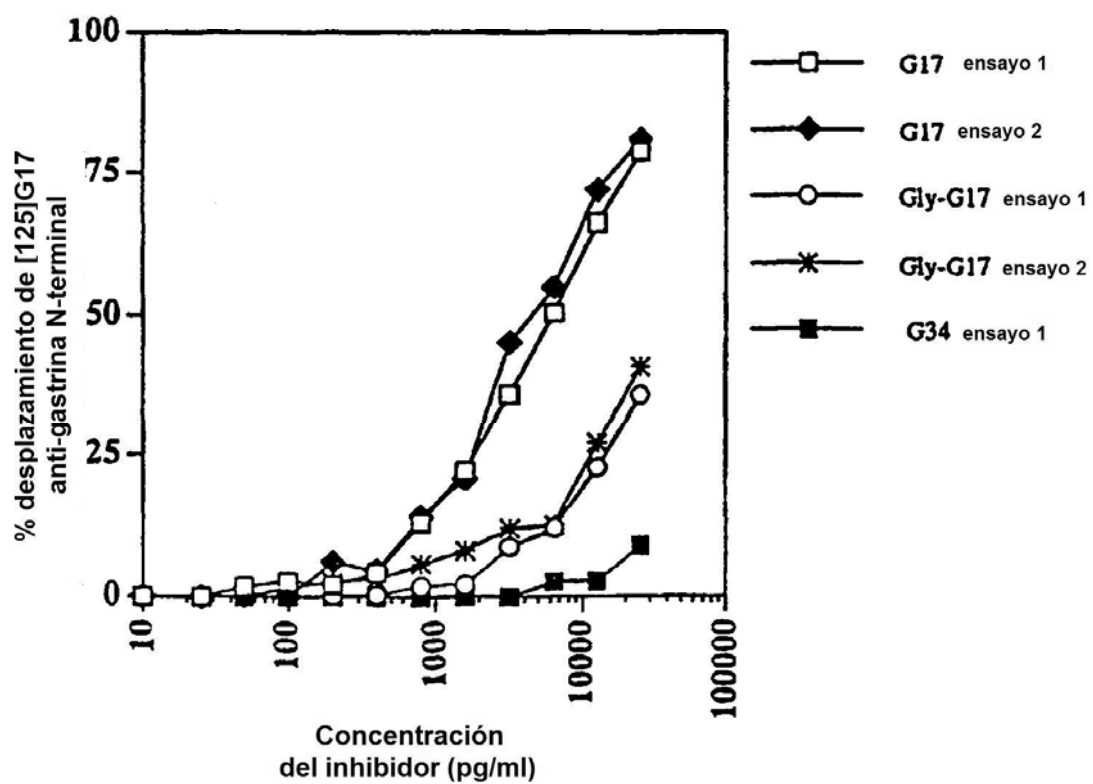


FIG. 3

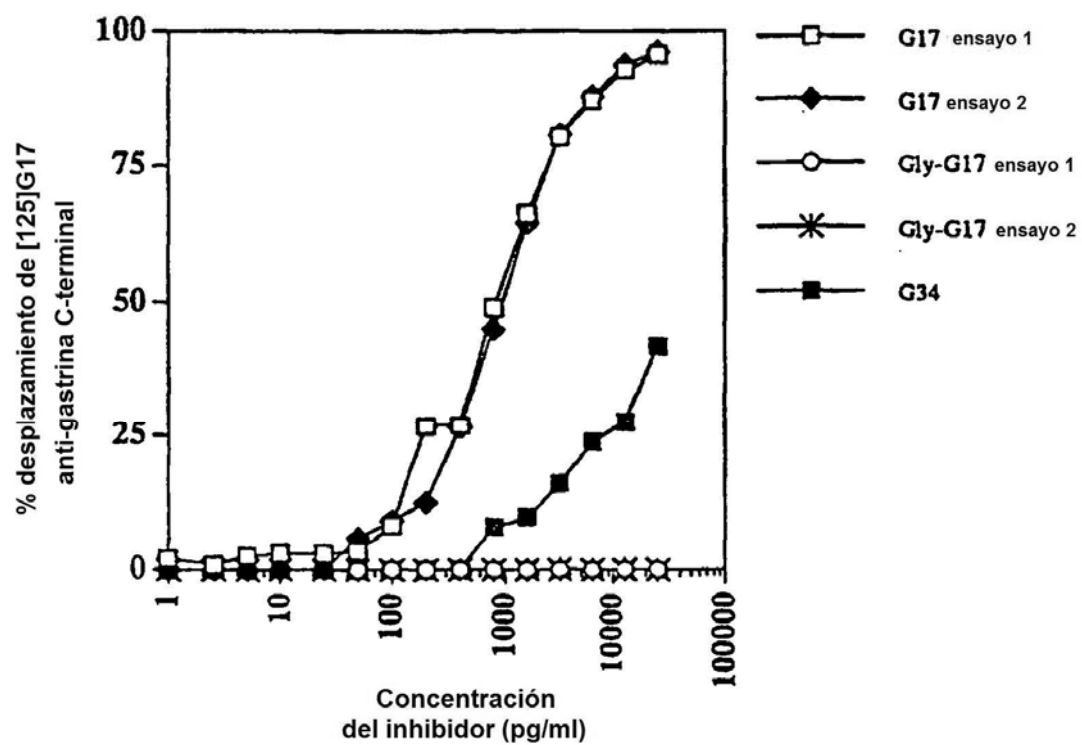


FIG. 4

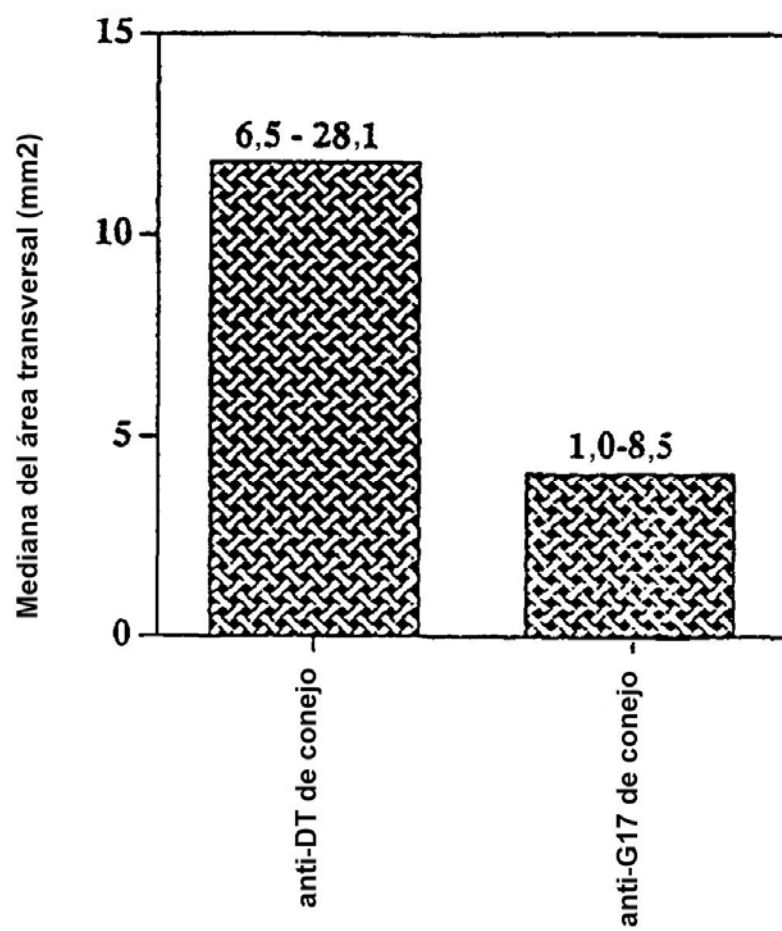


FIG. 5

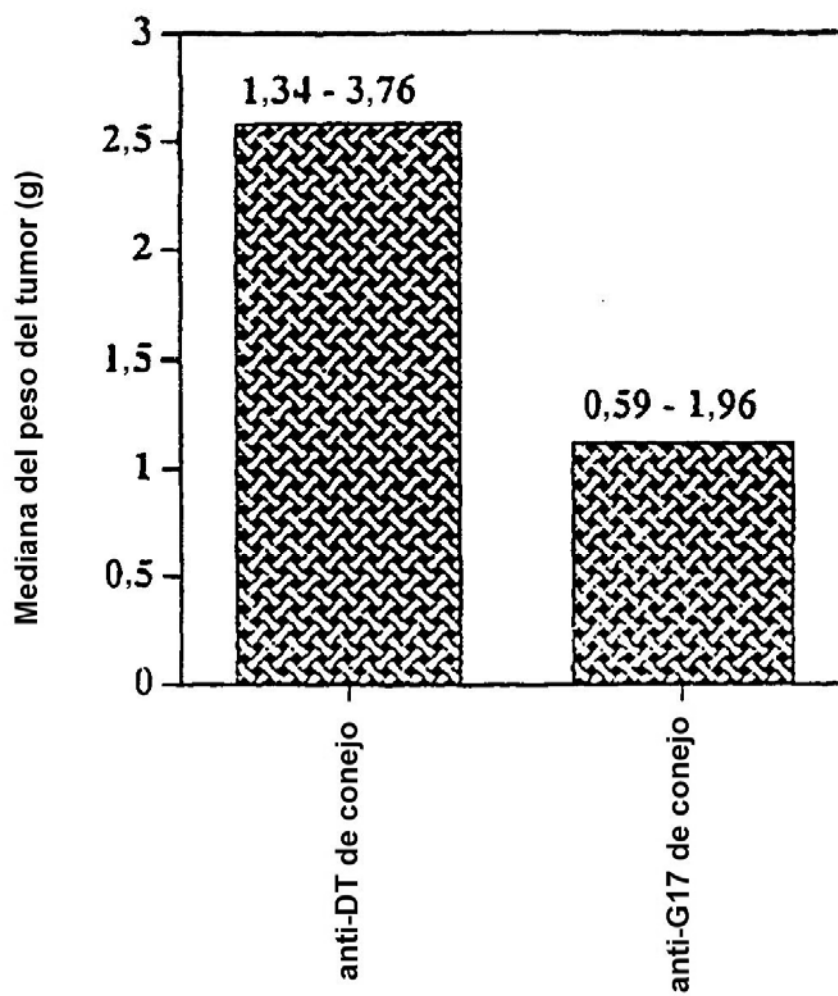


FIG. 6

