

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 871 092**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2011** **PCT/EP2011/062686**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012** **WO12013609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011** **E 11738200 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020** **EP 2598531**

54 Título: **Métodos y composiciones para la terapia del cáncer de hígado**

30 Prioridad:

15.04.2011 US 201161476204 P
26.07.2010 US 367851 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HOUHOU, LEILA;
DUMÉ, ANNE-SOPHIE;
JOUBERT, DOMINIQUE y
HOLLANDE, FREDERIC

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 871 092 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la terapia del cáncer de hígado

5 Campo de la invención

La presente exposición se refiere a, entre otras cosas, unos métodos de tratamiento de sujetos con cáncer de hígado o en riesgo de recurrencia de cáncer de hígado, mediante la administración en el sujeto de una composición que comprende un anticuerpo específico para la progastrina.

10 Antecedentes

El cáncer de hígado es el quinto cáncer más común globalmente y la tercera causa más común de muerte relacionada con el cáncer. Llovet *et al.*, "Hepatocellular carcinoma," *Lancet* 362:1907-17, 2003. La forma más común de cáncer de hígado es el carcinoma hepatocelular, asimismo conocido como CHC, y con frecuencia se desarrolla en el contexto de otros daños hepáticos subyacentes, típicamente hepatitis o cirrosis. Thorgeirsson *et al.*, "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma," *Nature Genetics* 31:339-346, 2002. Entre otras formas menos comunes de cáncer de hígado se incluyen el hepatoblastoma y el colangiocarcinoma.

El tratamiento estándar del cáncer de hígado es la resección quirúrgica, siempre que sea posible, y la quimioterapia, quimioembolización o la terapia de radiación en el caso de que la cirugía no sea una opción. La cirugía no siempre es una opción debido al tamaño o localización del tumor, o a cirrosis avanzada, e incluso con cirugía, la recurrencia/recaída del tumor complica el 70% de los casos a los 5 años de la resección. Ver Llovet *et al.*, *supra*. Los tratamientos quimioterápicos asimismo aparentemente presentan una eficacia reducida en el cáncer de hígado, posiblemente debido a la capacidad incrementada de las células de cáncer hepático de dar salida a los agentes quimioterápicos. De esta manera, existe una necesidad significativa y urgente de tratamientos más eficaces para el cáncer de hígado.

30 Sumario

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

La gastrina es una hormona peptídica intestinal que estimula la secreción del ácido gástrico. En los mamíferos adultos, es producida principalmente por las células G en el antro gástrico y en cierta medida en el intestino delgado superior y páncreas. Haciendo referencia a la figura 1, el gen de la gastrina se traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos denominado "preprogastrina" que contiene una secuencia de señal (subrayada) que se corta, dando lugar a la progastrina ("PG"), un polipéptido de 80 residuos aminoácidos. La gastrina, que se encuentra principalmente en tres formas: G34, G178 y G14 (no ilustradas), resulta del procesamiento de la progastrina.

Se ha informado de la presencia de formas incompletamente procesadas de gastrina, incluyendo la PG, en algunas muestras de tejido de cáncer hepático (ver, por ejemplo, Caplin *et al.*, "Expression and processing of gastrin in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar carcinoma and choangiocarcinoma", *J. Hepatol.* 30:519-526, 1999). Ahora se ha encontrado que pueden utilizarse enfoques antiprogastrina para monitorizar, tratar y prevenir el cáncer de hígado y/o su recurrencia. Tal como se demuestra por primera vez en la presente memoria, el ARNm de gastrina se encuentra elevado en las células madre de cáncer hepático y la capacidad de las células de cáncer hepática, o de las células madre aisladas de cáncer hepático, de formar esferas o esferoides de cáncer bajo condiciones de crecimiento de baja adherencia se reduce significativamente con anticuerpos antiprogastrina. Aunque sin restringirse a ninguna teoría de funcionamiento, los anticuerpos antiprogastrina con la capacidad de unirse a la progastrina ("PG") y de neutralizar la actividad biológica de la PG se cree que interfieren con el crecimiento de las células de cáncer hepático, especialmente las células iniciadoras de tumor hepático o células madre de cáncer. Se cree que lo anterior reduce el tamaño tumoral del cáncer hepático y evita la recurrencia del mismo. Estos resultados proporcionan nuevas herramientas para el tratamiento, la prevención y la monitorización del tratamiento del cáncer hepático.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la presente exposición proporciona métodos y composiciones útiles para tratar el cáncer hepático y evitar la recurrencia del mismo en animales, incluyendo seres humanos. Tal como se indica con mayor detalle posteriormente, los métodos de tratamiento implican la administración en un sujeto diagnosticado con cáncer hepático de una cantidad de un anticuerpo que se une específicamente a la progastrina ("anticuerpo anti-PG") eficaz para proporcionar un beneficio terapéutico. El anticuerpo anti-PG puede administrarse solo, como monoterapia o junto con, o complementariamente a, otras modalidades de tratamiento, tales como la resección tumoral, terapia de radiación, quimioterapia, terapia con otro anticuerpo, etc.

En el caso de que se utilice junto con, o complementariamente a, la resección tumoral, el anticuerpo anti-PG puede administrarse antes y/o después de la eliminación del tumor, y puede continuarse durante un periodo de tiempo específico después de la eliminación del tumor, hasta que se alcance un nivel plasmático y/o sérico de progastrina

inferior a un nivel umbral especificado, o hasta que se consiga una reducción de los niveles plasmáticos y/o séricos de progastrina durante un periodo de tiempo especificado.

En el caso de que se utilice junto con, o complementariamente a, quimioterapia, el anticuerpo anti-PG puede administrarse antes de la quimioterapia, concomitantemente con quimioterapia, o después de la quimioterapia. Nuevamente, el anticuerpo anti-PG puede administrarse durante un periodo de tiempo especificado, hasta alcanzar un nivel plasmático y/o sérico de progastrina inferior a un nivel umbral especificado, o hasta conseguir una reducción de los niveles plasmáticos y/o séricos de progastrina durante un periodo de tiempo especificado.

Las composiciones de la presente exposición contienen por lo menos un anticuerpo anti-PG que se une específicamente a PG y neutraliza su actividad biológica. Puede utilizarse cualquier anticuerpo anti-PG en los métodos de la presente exposición, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos anti-PG policlonales y monoclonales. Entre los anticuerpos anti-PG útiles para la utilización en los métodos de tratamiento y prevención dados a conocer en la presente memoria se incluyen los indicados posteriormente en la Sección 7.11. Preferentemente, el anticuerpo anti-PG es específico de la PG de la especie bajo tratamiento. Por ejemplo, se administra un anticuerpo anti-PG humana en un sujeto humano.

Las composiciones anti-PG adecuadas para la utilización en los métodos de la presente exposición pueden comprender un portador, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden formularse para diversas vías de administración tal como se indica en la presente memoria, y entre ellas se incluyen portadores, excipientes y/o diluyentes adecuados para la vía seleccionada. Con fines de tratamiento, los anticuerpos anti-PG pueden envasarse en dosis unitarias para facilitar el uso. Las dosis unitarias pueden empaquetarse en kits, que contienen un diluyente y, opcionalmente, instrucciones de utilización.

En otro aspecto, la presente exposición proporciona un método de monitorización de la eficacia del tratamiento anti-PG, mediante la medición de una concentración o nivel de PG en una muestra de sangre (suero, plasma o sangre completa) de un individuo con cáncer de hígado tratado con una composición anti-PG, y la comparación del nivel de PG medido con un nivel de línea base de PG. La línea base puede ser un nivel de PG en una muestra de sangre de un punto temporal anterior, por ejemplo al inicio del tratamiento. La medición que se compara con el nivel de línea base puede ser de una muestra obtenida durante o después de un curso de tratamiento. Un nivel de PG medido inferior al nivel de línea base es indicativo de eficacia del tratamiento y un nivel de PG medido igual o superior al nivel de línea base es indicativo de una falta de eficacia.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona secuencias de aminoácidos de preprogastrina humana (SEC ID nº 100), en la que la secuencia del péptido de señal se ha subrayado, progastrina humana madura (SEC ID nº 20) y determinados productos del procesamiento de la progastrina, incluyendo G34 (SEC ID nº 102), G34-Gly (SEC ID nº 103), G17 (SEC ID nº 104), G17-Gly (SEC ID nº 105) y CTFP (SEC ID nº 106).

La figura 2 proporciona secuencias de polinucleótido y de aminoácidos de cadenas ligeras variables y pesadas variables de determinados anticuerpos monoclonales anti-hPG murinos ejemplificativos. En cada caso, se muestran las tres CDR en texto en **negrita-subrayado**. Específicamente:

la figura 2A proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_H del MAb3 murino anti-hPG (SEC ID nº 12) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 16).

La figura 2B proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_L del MAb3 murino anti-hPG (SEC ID nº 13) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 17).

La figura 2C proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_H del MAb4 murino anti-hPG (SEC ID nº 14) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 18).

La figura 2D proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_L del MAb4 murino anti-hPG (SEC ID nº 15) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 19).

La figura 2E proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_H del MAb8 murino anti-hPG (SEC ID nº 59) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 67).

La figura 2F proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_L del MAb8 murino anti-hPG (SEC ID nº 63) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 71).

La figura 2G proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_H del MAb13 murino anti-hPG (SEC ID nº 60) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 68).

La figura 2H proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_L del MAb13 murino anti-hPG (SEC ID nº 65).

64) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 72).

La figura 2I proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_H del MAb16 murino anti-hPG (SEC ID nº 61) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 69).

La figura 2J proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_L del MAb16 murino anti-hPG (SEC ID nº 65) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 73).

La figura 2K proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_H del MAb19 murino anti-hPG (SEC ID nº 62) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 70), y

La figura 2L proporciona la secuencia polipeptídica de la cadena V_L del MAb19 murino anti-hPG (SEC ID nº 66) y una secuencia de polinucleótido codificante de la misma (SEC ID nº 74).

La figura 3 proporciona secuencias polipeptídicas proyectadas para las cadenas pesada y ligera variables humanizadas de anticuerpos monoclonales anti-hPG seleccionados indicados en la presente memoria. En cada caso, se muestran las tres CDR en texto en negrita-subrayado. Específicamente:

La figura 3A proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb3 humanizado (SEC ID nº 21).

La figura 3B proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb3 humanizado (SEC ID nº 22).

La figura 3C proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb4 humanizado (SEC ID nº 23).

La figura 3D proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb4 humanizado (SEC ID nº 24).

La figura 3E proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb8(a) humanizado (SEC ID nº 75).

La figura 3F proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb8(a) humanizado (SEC ID nº 76).

La figura 3G proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb8(b) humanizado (SEC ID nº 77).

La figura 3H proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb8(b) humanizado (SEC ID nº 78).

La figura 3I proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb8(c) humanizado (SEC ID nº 79).

La figura 3J proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb8(c) humanizado (SEC ID nº 76).

La figura 3K proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb13(a) humanizado (SEC ID nº 80).

La figura 3L proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb13(a) humanizado (SEC ID nº 81).

La figura 3M proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb13(b) humanizado (SEC ID nº 82).

La figura 3N proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb13(b) humanizado (SEC ID nº 83).

La figura 3O proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb16(a) humanizado (SEC ID nº 84).

La figura 3P proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb16(a) humanizado (SEC ID nº 85).

La figura 3Q proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb16(b) humanizado (SEC ID nº 86).

5 La figura 3R proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb16(b) humanizado (SEC ID nº 87).

La figura 3S proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb16(c) humanizado (SEC ID nº 88).

10 La figura 3T proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb16(c) humanizado (SEC ID nº 89).

15 La figura 3U proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb19(a) humanizado (SEC ID nº 90).

La figura 3V proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb19(a) humanizado (SEC ID nº 91).

20 La figura 3W proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb19(b) humanizado (SEC ID nº 92).

La figura 3X proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb19(b) humanizado (SEC ID nº 93).

25 La figura 3Y proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_H del MAb19(c) humanizado (SEC ID nº 94), y

30 La figura 3Z proporciona la secuencia de aminoácidos proyectada de la cadena V_L del MAb19(c) humanizado (SEC ID nº 95).

La figura 4 proporciona un gráfico de columnas de los niveles de ARNm de GAST en tumores respecto al nivel medio detectado en tejido hepático sano recogido de 14 individuos con cáncer de hígado (CHC).

35 La figura 5A-B proporciona gráficos de columnas de los niveles de ARNm de GAST en tres líneas celulares de cáncer de hígado - PLC/PRF/5 (figura 5A), Huh6 (figura 5B) y Huh7 (figura 5B) - en comparación con los niveles observados en una línea celular de cáncer colorrectal, SW480, que es conocido que presenta un nivel elevado de expresión de GAST.

40 La figura 6A-B proporciona gráficos de columnas de los niveles de ARNm de GAST en células de "población secundaria" (SP) Huh-6 (figura 6A) y Huh7 (figura 6B) en comparación con los niveles observados en un agregado no seleccionado de células Huh6 o Huh7 cultivado bajo condiciones de cultivo de baja adherencia.

45 La figura 7 proporciona un gráfico del número de tumores esféricos por pocillo de células PLC/PRL/5 bajo condiciones de cultivo de baja adherencia, en presencia de un anticuerpo monoclonal anti-PG ejemplificativo o un anticuerpo de control.

50 La figura 8 proporciona un gráfico del número de tumores esféricos por pocillo de células de "población secundaria" (SP) Huh6 cultivadas bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en presencia de doxorrubicina y dimetilsulfóxido (DMSO), DMSO solo, un anticuerpo policlonal anti-PG ejemplificativo o un anticuerpo policlonal de control.

55 La figura 9 proporciona un gráfico del número de tumores esféricos por pocillo de células de "población secundaria" Huh7 cultivadas bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en presencia de doxorrubicina y DMSO, DMSO solo, un anticuerpo policlonal anti-PG ejemplificativo o un anticuerpo policlonal de control.

La figura 10 proporciona un gráfico del número de tumores esféricos por pocillo de células Huh6 bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en medio solo ("Control") o con MAb13 anti-hPG o MAb19 anti-hPG.

60 La figura 11 proporciona un gráfico de columnas del número de tumores esféricos por pocillo de células Huh6 bajo condiciones de cultivo de baja adherencia después del crecimiento bajo condiciones de adherencia normales en medio solo ("Control") o con MAb8 anti-hPG o MAb13 anti-hPG.

65 La figura 12A-B proporciona gráficos del número de tumores esféricos por pocillo de células Huh7 cultivadas bajo condiciones de cultivo de baja adherencia. La figura 12A muestra células cultivadas en medio solo ("Control") frente a células tratadas con MAb13 anti-hPG. La figura 12B muestra células tratadas con uno de: un anticuerpo monoclonal de control ("MAb de control"), MAb13 anti-hPG y MAb16 anti-hPG.

La figura 13A-B proporciona gráficos del número de tumores esferoides por pocillo de células Huh7 cultivadas bajo condiciones de cultivo de baja adherencia después del crecimiento bajo condiciones de adherencia normales con MAb8 anti-hPG (figura 13a) o MAb16 anti-hPG (figura 13B) en comparación con un anticuerpo monoclonal de control ("MAb de control").

La figura 14 proporciona un gráfico del número de tumores esferoides por pocillo de células de "población secundaria" Huh7 bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en medio solo ("Control") o con MAb8 anti-hPG o MAb13 anti-hPG.

La figura 15A-C proporciona gráficos del número de tumores esferoides por pocillo de células PLC/PRL/5 tratadas con MAb19 anti-hPG (figura 15A) o MAb13 anti-hPG (figura 15B) o MAb8 anti-hPG y MAb13 (figura 15C) en comparación con un anticuerpo monoclonal de control ("MAb de control").

La figura 16 proporciona un gráfico de columnas del número de tumores esferoides por pocillo de células PLC/PRL/5 bajo condiciones de cultivo de baja adherencia después del crecimiento bajo condiciones de adherencia normales en uno de: un anticuerpo monoclonal de control ("MAb CT"), MAb8 anti-hPG o MAb16 anti-hPG.

La figura 17 proporciona un gráfico del número de tumores esferoides por pocillo de células de "población secundaria" PLC/PRL/5 bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en medio solo ("Control") o con MAb13 anti-hPG o MAb16 anti-hPG.

Descripción detallada

Cáncer de hígado

El cáncer de hígado incluye carcinoma hepatocelular (CHC), colangiocarcinoma y hepatoblastoma. La mayoría de cánceres de hígado son CHC y con frecuencia aparecen en individuos que sufren de otras patologías hepáticas subyacentes, entre ellas hepatitis, cirrosis y/o envenenamiento por aflatoxina B1, que causa inflamación hepática y lesión crónica y regeneración de células hepáticas. El diagnóstico del cáncer de hígado actualmente se basa en una combinación de ultrasonografía, biopsia con aguja fina y detección de los niveles circulantes de determinadas proteínas marcadoras, incluyendo, por ejemplo, la alfa-fetoproteína. La CHC puede clasificarse en cáncer temprano, intermedio, avanzado y de estadio terminal basándose en el tamaño, número y morfología tumorales (por ejemplo, encapsulado o invasivo) y la función hepática.

Entre los tratamientos actuales para el cáncer de hígado se incluyen el trasplante hepático, la resección quirúrgica, la ablación percutánea, la quimioterapia, incluyendo la quimioembolización, el tratamiento de radiación y el tratamiento de anticuerpos. El trasplante de hígado, aunque completamente curativo, no se encuentra disponible para la mayoría de pacientes debido al estadio de la enfermedad y/o la falta de órganos disponibles para el trasplante. La disponibilidad de los trasplantes asimismo puede estar limitada a los pacientes infectados por virus de hepatitis B o C, así como pacientes que sufren de alcoholismo. La resección quirúrgica y la ablación percutánea, procedimientos que eliminan o matan el tejido canceroso, pueden presentar buenos resultados, aunque no se encuentran disponibles para todos los pacientes. La localización o tamaño tumoral puede excluir la resección quirúrgica, al igual que la cirrosis u otros deterioros de la función hepática, debido al riesgo de insuficiencia del órgano asociado al procedimiento. Incluso en la resección del hígado, la recurrencia tumoral complica el 70% de los casos dentro de los primeros 5 años. La ablación percutánea destruye las células neoplásicas y resulta adecuada para individuos con un tumor menor de 3 cm que no sean candidatos para la resección quirúrgica. En individuos cuyo cáncer está más avanzado o en los que está afectada la función hepática, los tratamientos estándares son la quimioterapia y la terapia de radiación, con o sin embolización (oclusión de una arteria para cortar el suministro sanguíneo e inducir la muerte del tumor). Los tratamientos actualmente disponibles resultan inadecuados para satisfacer la necesidad de terapia eficaz que puedan utilizarse para tratar la mayoría de individuos afectados por cáncer de hígado.

Recurrencia del cáncer de hígado

La recurrencia resulta especialmente problemática en el cáncer de hígado. Se entiende recurrencia del cáncer generalmente como un retorno del cáncer después del tratamiento y después de un periodo de tiempo durante el que no puede detectarse el cáncer anterior. Se han planteado diversas explicaciones para la elevada tasa de recurrencia del cáncer de hígado, incluyendo el fracaso en la eliminación de todas las células de cáncer durante los procedimientos quirúrgicos, la diseminación de las células de cáncer por los instrumentos durante la ablación percutánea y la resistencia a los agentes quimioterápicos. Existe una necesidad de terapias para el cáncer de hígado que reduzcan o eliminen la recurrencia.

Células madre de cáncer

Los tumores sólidos no son necesariamente tejidos homogéneos. Por el contrario, algunos tumores comprenden una pluralidad de tipos celulares aberrantes que presentan propiedades fenotípicas y funcionales diferentes. A este respecto, dichos tumores son análogos a los órganos anormales. Las células que comprenden tumores sólidos difieren con respecto al grado en que son capaces de iniciar la formación de un nuevo tumor al trasplantarlas a un sitio nuevo en el mismo huésped, o a un nuevo huésped de la misma especie o de una especie diferente. Las células que presentan dicha propiedad se conocen como células iniciadoras de tumor o cáncer, o alternatively, células madre de tumor o cáncer. Ver, por ejemplo, Chiba *et al.*, "Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective", Cancer Letters 286:145-153, 2009. Dichas células forman tumores al trasplantarlas en ratones inmunodeficientes en números mucho menores que los números requeridos para que un agregado no seleccionado de células de cáncer de hígado forme tumores en dichos ratones (1000 células de "población secundaria" de cáncer de hígado frente a 1 millón de células de cáncer de hígado no seleccionadas). Ver Chiba *et al.*, *supra*.

Generalmente, las células madre de cáncer se definen por dos propiedades: la capacidad de autorrenovación y la capacidad de dar lugar a células hija que se diferencian en células que no son células madre. La autorrenovación es la capacidad de experimentar división celular, en la que una o ambas células hijas se mantienen sin diferenciar, conservando la capacidad de dar lugar a todavía otra célula madre de cáncer con capacidad de proliferación similar a la de la célula parental. Dicha propiedad permite a las células madre de cáncer dar lugar finalmente a un gran número de células que comprenden el tumor en crecimiento. Las células madre de cáncer asimismo presentan la capacidad de producir células hija que se diferencian, dando lugar a un espectro de células que no son células madre más diferenciadas, o células tumorales en masa, observadas en muchos tumores sólidos. De esta manera, al trasplantarlas, las células madre de cáncer pueden reconstituir el tipo de tumor a partir del cual se han originado, incluso después de múltiples trasplantes en serie. Además, se cree que las células madre de cáncer incluyen mutaciones genéticas y/o cambios epigenéticos que resultan en patrones de proliferación alterados y/o tasas bajas de apoptosis.

Las células madre de cáncer pueden identificarse de acuerdo con varias características fenotípicas que las distinguen de las células tumorales en masa. En primer lugar, tal como se ha señalado anteriormente, las células madre de cáncer de hígado poseen la capacidad de iniciar un nuevo tumor al trasplantarlas en un nuevo huésped. En contraste, las células tumorales en masa son incapaces de iniciar nuevos tumores o requieren muchas más células que las células madre de cáncer para formar un nuevo tumor. Ver Chiba *et al.*, "Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective", Cancer Letters 286:145-153, 2009.

Los métodos útiles para evaluar si una línea celular tumoral o de cáncer contiene células madre de cáncer resultarán familiares al experto en la materia. A título de ejemplo no limitativo, se aísla un tumor, o una parte del mismo que se sospecha que contiene células madre de cáncer, tal como mediante resección quirúrgica. Después, el tejido tumoral se tritura y se trata con enzimas, o algún otro tratamiento, eficaz para desagregar el tumor y liberar sus células constituyentes. Alternativamente, en donde se someta a análisis una línea celular, podría resultar necesario sólo disociar las células con un tratamiento enzimático o químico. Alternativamente, puede prepararse una subpoblación celular, seleccionada basándose en uno o más de los fenotipos indicados en la presente memoria, tal como la presencia o ausencia de proteínas marcadoras o la capacidad de excluir pigmentos u otras sustancias. Las poblaciones celulares que no presentan el perfil o perfiles de marcadores, exclusión de pigmentos u otra propiedad asociada a las células madre de cáncer pueden prepararse a modo de control.

Tras el aislamiento de las subpoblaciones celulares relevantes, a continuación, se implanta un número predeterminado de dichas células en uno o más tejidos u órganos diana en un animal receptor. En algunas formas de realización, el animal receptor es un ratón inmunodeficiente, incluyendo, aunque sin limitación, ratones desnudos, ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y ratones SCID no obesos-diabéticos (NOD-SCID). Asimismo pueden utilizarse otras especies, según los conocimientos del experto ordinario en la materia.

Las células pueden implantarse subcutáneamente o dentro del hígado. Las células asimismo pueden implantarse en otros tejidos y órganos. En algunas formas de realización, el tejido u órgano diana se selecciona para replicar el tejido u órgano de origen del tumor bajo análisis. Sin embargo, en otras formas de realización, se seleccionan tejidos u órganos definidos en los que alojar las células implantadas.

Tras implantar las células utilizando técnicas familiares para el experto ordinario en la materia, los animales se dejan sin perturbaciones durante un periodo de tiempo y pueden evaluarse para determinar si ha crecido un nuevo tumor en el sitio de la implantación. Para las células implantadas subcutáneamente, el crecimiento tumoral puede evaluarse mediante examen visual y palpación del sitio de implantación. En el caso de que un tumor sea detectable, puede medirse su tamaño durante el tiempo utilizando calibradores. Para las células implantadas en un órgano interno, el animal puede sacrificarse en un tiempo predeterminado postimplantación a fin de determinar si se encuentra presente uno o más tumores y, en caso positivo, el número y tamaño de dicho tumor o tumores. Alternativamente, según los conocimientos del experto ordinario en la materia, pueden utilizarse técnicas no invasivas para evaluar el crecimiento tumoral.

En segundo lugar, las células madre de cáncer asimismo son identificables a partir de su expresión o no expresión de determinados marcadores, mientras que las células tumorales en masa del mismo tumor presentan patrones diferentes de expresión de marcadores. En algunas formas de realización, la ausencia de expresión de un marcador es indicativa del fenotipo de célula madre de cáncer. Entre dichos marcadores se incluyen proteínas expresadas dentro de la célula o sobre la superficie celular, y pueden detectarse mediante la utilización de una diversidad de técnicas, entre ellas, aunque sin limitación, la inmunohistoquímica, la inmunofluorescencia y el análisis de FACS. Se han identificado células madre de cáncer de hígado mediante los marcadores de superficie celular. Las células de cáncer de hígado que portan uno o más marcadores de superficie celular, incluyendo CD133, CD90 y CD44, aparentemente presentan propiedades de iniciador de tumor incrementadas y se han caracterizado como células madre de cáncer de hígado.

En tercer lugar, las células madre de cáncer de hígado asimismo se han identificado a partir de su capacidad de expulsar pigmentos y fármacos mediante transportadores proteicos. Las células de cáncer de hígado iniciadores de tumor se han identificado basándose en la capacidad de excluir el pigmento Hoechst 33342 mediante un transportador ABC. Dichas células pueden identificarse mediante su exposición al pigmento fluorescente y utilizando el análisis de FACS para separar las células que incorporan dichos pigmentos de las que los excluyen. Dichas células de cáncer excluyentes de pigmento se denominan células de población secundaria (SP). Las células SP pueden iniciar tumores a partir de tan solo 1000 células (Chiba *et al.*, "Side-population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties", *Hepatology* 44: 240-251, 2006). Otras técnicas para detectar las células madre de cáncer de hígado asimismo resultan posibles, según los conocimientos del experto ordinario en la materia.

Además de la capacidad de iniciar tumores *in vivo*, en la que las células tumorales en masa son incapaces o presentan una capacidad significativamente inferior de ello, las células madre de cáncer asimismo muestran una capacidad incrementada de crecer bajo condiciones de cultivo de baja adherencia libre de suero, en comparación con las células tumorales en masa y pueden, dependiendo del tipo de cáncer, formar los denominados esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia. Los esferoides son bolas compactadas de células que se forman debido a que determinadas células crecen en cultivo tras sembrarlas como suspensiones desagregadas. La formación de dichos esferoides se estimula al cultivar las células en medio sin suero, generalmente en presencia de factores de crecimiento específicos (incluyendo, aunque sin limitación, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)), y en placas de cultivo tisular que presentan superficies a las que las células de mamífero se adhieren poco. De manera similar a las células madre de tejidos normales, se ha encontrado que las células madre de cáncer preferentemente crecen en forma de esferoides bajo las condiciones de cultivo apropiadas. Ver, por ejemplo, Rappa, G., *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 314:2110, 2008; Singh, S.K., *et al.*, *Cancer Res.*, 63:5821, 2003; Fang, D., *et al.*, *Cancer Res.*, 65:9328, 2005. Los ensayos para el crecimiento de esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia, o condiciones de crecimiento de esferoides, se describen en los Ejemplos, posteriormente, y asimismo se encuentran comprendidos dentro de los conocimientos del experto en la materia.

Papel de las células madre de cáncer en la recurrencia del cáncer de hígado

Se han identificado células tumorales con propiedades de células madre de cáncer que muestran una resistencia potenciada a la radiación y/o a agentes quimioterápicos. Eyler, C.E., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 26:2839-2845, 2008. La resistencia incrementada de las células madre de cáncer a la radiación y a la quimioterapia no sólo reduce la eficacia de dichas terapias, sino que asimismo permite que dichas células persistan incluso una vez los tumores ya no son detectables y la terapia ha sido un éxito. En dichos pacientes, el tratamiento resulta inicialmente eficaz, causando que los tumores encojan o desaparezcan en los escaneos diagnósticos, aunque los tumores reaparecen algún tiempo después de cesar el tratamiento. Lo anterior podría explicar, a su vez, el fenómeno de recurrencia en individuos previamente tratados para cáncer de hígado. Eyler, *supra*. La inhibición del crecimiento, o la eliminación, de las células madre de cáncer de hígado en un sujeto que ha sido previamente tratado para cáncer de hígado, en donde no existen signos actuales de cáncer de hígado, por lo tanto, podría evitar una recurrencia.

Anticuerpos anti-PG y su efecto sobre las células madre de cáncer de hígado

Tal como se muestra en los Ejemplos, posteriormente, los tumores de cáncer de hígado y las líneas celulares de CHC muestran una expresión incrementada del gen de gastrina (GAST) que codifica la progastrina. Dicha expresión incluso se encuentra adicionalmente elevada en las células de "población secundaria", que portan las características de las células madre de cáncer de hígado, en dos líneas celulares diferentes de cáncer de hígado. Aunque sin pretender restringirse a ninguna teoría de funcionamiento, se cree que una manera de tratar el cáncer de hígado, inicial o recurrente, es la administración de un agente que inhiba el crecimiento de células madre de cáncer de hígado, y que preferentemente inhiba la capacidad de las células iniciadoras de tumor de formar tumores.

Los solicitantes han descubierto que los anticuerpos antiprogastrina son tales agentes. Tal como se da a conocer en la presente memoria, inesperadamente se ha encontrado que el crecimiento de células madre de cáncer de hígado puede inhibirse mediante tratamiento con anticuerpos que reconocen específicamente la progastrina

humana ("hPG"). Basándose en estos inesperados resultados, se espera que la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-hPG en un paciente con cáncer que contiene células madre de cáncer de hígado presentaría un beneficio terapéutico mediante, por ejemplo, aunque sin limitación, la reducción de la capacidad de dichas células de contribuir al cáncer de hígado o a su recurrencia.

Se cree que los anticuerpos anti-PG de la presente exposición resultan eficaces para inhibir el crecimiento de las células madre de cáncer de hígado mediante la unión a la progastrina, evitando de esta manera que interactúe con su receptor o receptores putativos, aunque sean desconocidos, sobre las células madre de cáncer. La progastrina, producida por las células madre de cáncer mismas o por tejidos sanos, por lo tanto, resulta bloqueada en su mediación de efectos biológicos de estimulación del crecimiento de dichas células. En consecuencia, se cree que la neutralización de PG, como hacen los anticuerpos anti-PG de la presente exposición, bloquea la interacción de PG con su receptor o receptores sobre dichas células y puede causar que las células mueran, posiblemente como resultado de la apoptosis, y/o que detengan o enlentezcan la división celular. Otros mecanismos por los que los anticuerpos anti-PG interfieren con la supervivencia y/o crecimiento de las células madre de cáncer asimismo resultan posibles, y no se pretende limitar el alcance de la invención dada a conocer en la presente memoria. La capacidad de un anticuerpo anti-PG de neutralizar la actividad de PG puede determinarse utilizando ensayos conocidos por el experto en la materia, incluyendo ensayos de inhibición del crecimiento celular *in vitro*, tales como los indicados en los Ejemplos, posteriormente.

Métodos de tratamiento del cáncer de hígado

La presente exposición proporciona métodos de tratamiento de cáncer de hígado en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo antiprogastina ("anti-PG") que presenta un efecto terapéutico. Los métodos de tratamiento de cáncer de hígado según la presente exposición se llevan a cabo mediante la administración de uno o más anticuerpos anti-PG capaces de neutralizar la PG, descritos en detalle posteriormente, en la sección 7.11, en individuos con cáncer de hígado. Puede utilizarse en los métodos de la presente exposición cualquier anticuerpo que neutralice la PG, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos anti-PG policlonales y monoclonales (por ejemplo, quiméricos, humanizados, totalmente humanos, de longitud completa, Fab y de cadena sencilla). Los anticuerpos anti-PG adecuados son capaces de inhibir el crecimiento de las células de cáncer de hígado *in vitro*. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-PG son capaces de inhibir el crecimiento de esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia por células de cáncer de hígado con propiedades iniciadoras de tumor, incluyendo células madres de cáncer de hígado, células de cáncer de hígado portadoras de uno o más marcadores de superficie celular seleccionados de entre el grupo que consiste en CD133, CD44 y CD90, y células de cáncer de hígado capaces de exportar el pigmento Hoechst 33342.

Los sujetos en necesidad de tratamiento para el cáncer de hígado son individuos diagnosticados con cáncer de hígado. El cáncer de hígado puede ser una primera ocurrencia o una recurrencia. Entre los sujetos adecuados se incluyen individuos con una concentración sanguínea elevada de PG, individuos cuyo cáncer de hígado no es tratable por otros medios, tales como individuos con tumores inoperables o individuos en los que han fracasado otros tipos de terapia, e individuos que han recibido otro tratamiento para el cáncer de hígado, incluyendo la resección quirúrgica, la quimioterapia, la quimioembolización, la terapia de radiación o la terapia de anticuerpos con un anticuerpo diferente de los anticuerpos anti-PEG de la presente exposición. Entre los sujetos adecuados se incluyen además individuos previamente tratados para cáncer de hígado, quienes, después de un periodo de remisión, presentan cáncer de hígado recurrente. El cáncer de hígado puede encontrarse en cualquier estadio de progresión. El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano, incluyendo un animal domesticado o un animal no domesticado.

El tratamiento anti-PG puede administrarse solo, como monoterapia, o en combinación con, o complementariamente a, otro u otros tratamientos para el cáncer de hígado. Entre otros tratamientos se incluyen, aunque sin limitación, la resección quirúrgica, y el tratamiento con un segundo tratamiento terapéutico, tal como un agente quimioterápico, un agente de radiación o un anticuerpo, tal como se indica en la presente memoria. El tratamiento de combinación tal como se proporciona en la presente memoria implica la administración de por lo menos dos tratamientos en un paciente, uno de los cuales es un tratamiento anti-PEG con por lo menos un anticuerpo anti-PG, y en el que el otro es el tratamiento con un agente o procedimiento terapéutico.

El tratamiento anti-PG puede combinarse con procedimientos quirúrgicos, tales como la resección quirúrgica o la ablación percutánea. Pueden administrarse anticuerpos anti-PG en sujetos con cáncer de hígado primario o recurrente, en combinación con resección quirúrgica o ablación percutánea de la parte o partes afectadas del hígado. El tratamiento anti-PG puede iniciarse antes, concurrentemente o después de la resección quirúrgica.

El tratamiento anti-PG puede combinarse con terapia de radiación. La terapia de radiación es la utilización de radiación de alta energía de rayos X, rayos gamma, neutrones, protones y otras fuentes para matar células de cáncer y encoger tumores. La radiación puede proceder de una máquina exterior al cuerpo (terapia de radiación de haz externo) o puede proceder de material radioactivo introducido en el cuerpo en proximidad a las células de cáncer (terapia de radiación interna, o braquiterapia). Por ejemplo, el cáncer de hígado se ha tratado con radiación interna de ¹³¹I. La terapia de radiación sistémica utiliza una sustancia radiactiva, tal como un anticuerpo monoclonal

marcado radioactivamente, que viaja por la sangre hasta los tejidos de todo el cuerpo. La terapia de radiación asimismo puede denominarse irradiación y radioterapia. Entre otras terapias de radiación se incluyen la terapia de radiación conformal tridimensional (3D-CRT) y la terapia de radiación de intensidad modulada (IMRT). Asimismo resultan posibles otras terapias de radiación.

5

El tratamiento de anticuerpos anti-PG asimismo puede combinarse con un agente quimioterápico. La quimioterapia es la utilización de fármacos de molécula pequeña que matan (citotóxicos o citocidas) o evitan el crecimiento (citostáticos) de células de cáncer. Para el cáncer de hígado, con frecuencia se combinan los agentes quimioterápicos con tratamientos de embolización, tales como, por ejemplo, la combinación de gelatina para embolización y doxorrubicina, mitomicina o cisplatino como agentes quimioterápicos. Entre los agentes quimioterápicos se incluyen, aunque sin limitación, toxinas, asimismo denominadas citotoxinas o agentes citotóxicos, que incluyen cualquier agente que resulte perjudicial a la viabilidad de las células, agentes y liposomas u otras vesículas que contienen compuestos quimioterápicos. Entre los ejemplos de agentes quimioterápicos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 1-deshidrotosterona, 5-fluorouracilo decarbazona, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleucina, agentes alquilantes, alopurinol sodio, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC), agentes antimitóticos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), diamino dicloro platino, antraciclinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG viva (intravesical), fosfato de betametasona sódica y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfán, leucovorina cálcica, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), clorambucilo, cisplatino, cladribina, colquicina, estrógenos conjugados, ciclofosfamida, ciclotosfamida, citabarina, citarabina, citocalasina B, citoxano, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), HCl de daunorrubicina, citrato de daunorrubicina, denileucina diftotox, dexrazoxano, dibromomanitol, dihidroxi-antracín-diona, docetaxel, mesilato de dolasetrón, HCl de doxorrubicina, dronabinol, L-asparaginasa de *E. coli*, emetina, epoyetina- α , L-asparaginasa de Erwinia, estrógenos esterificados, estradiol, estramustina fosfato sódico, bromuro de etidio, etinil-estradiol, etidronato, factor de etopósido citrororum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, HCl de gemcitabina, glucocorticoides, acetato de goserrelina, gramicidina D, HCl de granisetrón, hidroxurea, HCl de idarrubicina, ifosfamida, interferón α -2b, HCl de irinotecán, letrozol, leucovorina cálcica, acetato de leuprorrelina, HCl de levamisol, lidocaína, lomustina, maitansinoide, HCl de mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, HCl de melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreótide, HCl de ondansetrón, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato disódico, pentostatina, HCl de pilocarpina, pirlimicina, polifeprosán 20 con implante de carmustina, porfímero sódico, procaína, HCl de procarbazona, propranolol, rituximab, sargramostim, sorafenib, estreptozotocina, tamoxifeno, taxol, tegafur, tenipósido, tenopósido, testolactona, tetracaína, tiotepa clorambucilo, tioguanina, tiotepa, HCl de topotecán, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina.

Los anticuerpos anti-PG asimismo pueden administrarse con una combinación de agentes quimioterápicos. Entre las combinaciones ejemplificativas de agentes quimioterápicos se 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. La utilización de otras combinaciones de agentes quimioterápicos dados a conocer en la presente memoria asimismo resulta posible.

45

Los regímenes de administración estándares para agentes quimioterápicos utilizados para pacientes que presentan cáncer de hígado pueden utilizarse en los métodos de la presente exposición. Tal como es conocido en la técnica relevante, se han estandarizado en ensayos clínicos, regímenes de quimioterapia para el cáncer de hígado que utilizan combinaciones de diferentes agentes quimioterápicos. Ver Llovet *et al.*, *supra*, para un resumen de ensayos clínicos que utilizan agentes quimioterápicos.

50

Asimismo pueden utilizarse anticuerpos anti-PG en combinación con otros anticuerpos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales que matan directa o indirectamente, enlentecen o detienen el crecimiento de las células de cáncer. Dichos anticuerpos pueden funcionar mediante una diversidad de mecanismos diferentes. Por ejemplo, determinados anticuerpos pueden marcar células de cáncer para el ataque por el sistema inmunitario del paciente mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) u otros mecanismos. Se cree que el rituximab (Rituxan®), que se une al antígeno CD20 presente sobre las células B, y el edrecolomab, que se une al antígeno 17-1A, podrían funcionar de esta manera. Otros anticuerpos se unen y alteran o inhiben la función de antígenos que requieren las células de cáncer para la supervivencia o el crecimiento. Se cree que varios anticuerpos funcionan de esta manera, incluyendo, por ejemplo, cetuximab (Erbix®) y

60

panitumumab (Vectibix®), cada uno de los cuales se une al receptor de EGF (EGFR), y bevacizumab (Avastin®), que se une al factor de crecimiento VEGF. Asimismo resultan posibles otros mecanismos, y anticuerpos particulares podrían ser capaces de funcionar mediante uno o más mecanismos de acción. Todavía otros anticuerpos pueden conjugarse con fracciones radioactivas o quimotóxicas y dirigirlas a las células de cáncer que expresan preferentemente antígenos reconocidos específicamente por los anticuerpos.

El anticuerpo anti-PG y un segundo agente pueden administrarse simultáneamente, sucesivamente o por separado. Tal como se utiliza en la presente memoria, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente se entiende que se administran sucesivamente en el caso de que se administren en el paciente el mismo día, por ejemplo durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva puede producirse separada por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 horas. En contraste, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente se considera que se han administrado por separado en el caso de que se administren en el paciente en días diferentes, por ejemplo, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente terapéutico pueden administrarse a intervalos de 1 día, 2 días o 3 días, una semana, 2 semanas o un mes. En los métodos de la presente exposición, la administración del anticuerpo anti-PG de la exposición puede preceder o seguir a la administración del segundo agente. A título de ejemplo no limitativo, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente pueden administrarse concurrentemente durante un periodo de tiempo, seguido de un segundo periodo de tiempo en el que se alterna la administración de anticuerpo anti-PG y el segundo agente.

Métodos de prevención de la recurrencia del cáncer de hígado

En otro aspecto, la presente exposición proporciona un método de prevención de la recurrencia del cáncer de hígado, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-PG en un sujeto que necesita prevención. Los métodos de prevención de la recurrencia del cáncer de hígado según la presente exposición se llevan a cabo mediante la administración de uno o más anticuerpos anti-PG capaces de neutralizar la PG, descritos en detalle posteriormente, en la sección 7.11, en individuos en riesgo de recurrencia de cáncer de hígado.

Los sujetos que requieren prevención de la recurrencia del cáncer de hígado son individuos anteriormente tratados para cáncer de hígado que están en riesgo, pero no han sido nuevamente diagnosticados con cáncer de hígado. Entre los sujetos adecuados se incluyen individuos anteriormente tratados para cáncer de hígado mediante cualesquiera medios, incluyendo la resección quirúrgica, la quimioterapia o cualquier otra terapia.

La prevención eficaz de la recurrencia de cáncer de hígado incluye, aunque sin limitación, una ausencia completa y continua de recurrencia del cáncer de hígado. En algunas formas de realización, la prevención eficaz se mide mediante la ausencia de tumores de cáncer de hígado o células madre de cáncer de hígado obtenidas de un sujeto en riesgo de recurrencia de cáncer de hígado. En algunas formas de realización, la prevención eficaz se determina mediante una falta de incremento de la concentración sanguínea de PG en un sujeto en riesgo de recurrencia del cáncer de hígado.

El tratamiento anti-PG puede administrarse solo, como monoterapia, o en combinación con, o complementariamente a, otro u otros tratamientos. Entre otros tratamientos se incluyen, aunque sin limitación, la resección quirúrgica, y el tratamiento con un segundo agente terapéutico, tal como un agente quimioterápico, un agente de radiación o un anticuerpo, tal como se indica en la presente memoria. El tratamiento de combinación tal como se proporciona en la presente memoria implica la administración de por lo menos dos tratamientos en un paciente, uno de los cuales es un tratamiento anti-PG con por lo menos un anticuerpo anti-PG, y en el que el otro es el tratamiento con un agente o procedimiento terapéutico.

El anticuerpo anti-PG y un segundo agente pueden administrarse simultáneamente, sucesivamente o por separado. Tal como se utiliza en la presente memoria, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente se entiende que se administran sucesivamente en el caso de que se administren en el paciente el mismo día, por ejemplo durante la misma visita del paciente. La administración sucesiva puede producirse separada por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 horas. En contraste, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente se considera que se han administrado por separado en el caso de que se administren en el paciente en días diferentes, por ejemplo, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente terapéutico pueden administrarse a intervalos de 1 día, 2 días o 3 días, una semana, 2 semanas o un mes. En los métodos de la presente exposición, la administración del anticuerpo anti-PG de la exposición puede preceder o seguir a la administración del segundo agente. A título de ejemplo no limitativo, el anticuerpo anti-PG y el segundo agente pueden administrarse concurrentemente durante un periodo de tiempo, seguido de un segundo periodo de tiempo en el que se alterna la administración de anticuerpo anti-PG y el segundo agente.

Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-PG útiles en los métodos de la presente exposición pueden formularse en composiciones. Opcionalmente, las composiciones pueden comprender uno o más agentes adicionales, tales como los segundos agentes indicados anteriormente. Las composiciones habitualmente se suministran como parte de una composición farmacéutica, que es estéril y que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede ser cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración de la misma en el individuo).

Los anticuerpos anti-PG pueden administrarse en un individuo mediante una diversidad de vías, tales como la oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraocular, tópica, intratecal e intracerebroventricular. La vía 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 la condición física del sujeto. Los anticuerpos pueden formularse en forma de una solución acuosa y administrarse mediante inyección subcutánea. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la utilización en la exposición pueden adoptar una amplia diversidad de formas dependiendo, por ejemplo, de la afección que debe tratarse o la vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un anticuerpo anti-PEG en cada dosis. Dicha unidad puede contener, por ejemplo, 5 mg a 5 g, por ejemplo 10 mg a 1 g, o 20 a 50 mg de anticuerpo anti-PG en cada dosis unitaria. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender anticuerpos anti-PG capaces de unión a más de un epítipo de PG. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una combinación de anticuerpos anti-PG, cada uno capaz de unirse a un epítipo de PG diferente.

Las composiciones farmacéuticas de la exposición pueden prepararse para el almacenamiento en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mediante la mezcla del anticuerpo que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales típicamente utilizados en la técnica (la totalidad de los cuales se denominan "portadores" en la presente memoria), es decir, agentes tamponadores, agentes estabilizadores, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros diversos aditivos. Ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos deben ser no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas.

Los agentes tamponadores ayudan a mantener el pH en el intervalo que aproxima las condiciones fisiológicas. Pueden encontrarse presentes a una concentración de entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 50 mM. Entre los agentes tamponadores adecuados para la utilización con la presente exposición se incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos, tales como tampones de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico-succinato monosódico, mezcla de ácido succínico-hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico-tartrato sódico, mezcla de ácido tartárico-tartrato potásico, mezcla de ácido tartárico-hidróxido sódico, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico-fumarato monosódico, ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico, fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico-gluconato sódico, mezcla de ácido glucónico-hidróxido sódico, mezcla de ácido glucónico-gluconato potásico, etc.), tampones de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico-oxalato sódico, mezcla de ácido oxálico-hidróxido sódico, mezcla de ácido oxálico-oxalato potásico, etc.), tampones de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico-lactato sódico, mezcla de ácido láctico-hidróxido sódico, mezcla de ácido láctico-lactato potásico, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético-acetato sódico, mezcla de ácido acético-hidróxido sódico, etc.). Adicionalmente, pueden utilizarse tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina, tales como Tris.

Pueden añadirse conservantes para retrasar el crecimiento microbiano y pueden añadirse en cantidades comprendidas entre 0.2% y 1% (p/v). Entre los conservantes adecuados para la utilización con la presente exposición se incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y alquilparabenos, tales como metilparabeno o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Pueden añadirse isotonicantes, en ocasiones conocidos como "estabilizadores", para garantizar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente exposición y entre ellos se incluyen alcoholes de azúcar polihídrico, por ejemplo alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes con un abanico de funciones entre agente de carga y aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a evitar la desnaturalización o adherencia a las paredes del envase. Los estabilizadores típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihídricos (indicados anteriormente); aminoácidos, tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitoles, tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato sódico; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, manosa, fructosa y glucosa; disacáridos, tales como lactosa, maltosa y sacarosa, y trisacáridos, tales como rafinosa, y polisacáridos, tales como dextrano. Los estabilizadores pueden encontrarse presentes en un intervalo de 0.1 a 10,000 partes en peso por cada parte de proteína activa en peso.

Pueden añadirse tensioactivos o detergentes no iónicos (asimismo conocidos como "agentes humectantes") para

ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica afrente a la agregación inducida por la agitación, que asimismo permite exponer la formulación a tensiones de cizalla superficial sin causar la desnaturalización de la proteína. Entre los tensioactivos no iónicos se incluyen los polisorbatos (20, 80, *etc.*), polioxámeros (184, 188, *etc.*), polioles plurónicos y los monoéteres de polioxietilén-sorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, *etc.*). Los tensioactivos no iónicos pueden encontrarse presentes en un intervalo de entre aproximadamente 0.05 mg/ml y aproximadamente 1.0 mg/ml, por ejemplo de entre aproximadamente 0.07 mg/ml y aproximadamente 0.2 mg/ml.

Entre los diversos excipientes adicionales se incluyen agentes de carga (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina y vitamina E) y cosolventes.

Los anticuerpos anti-PG pueden administrarse individualmente o en forma de mezclas de uno o más anticuerpos anti-PG, en mezcla o en combinación con otros agentes útiles en el tratamiento del cáncer de hígado. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de terapias de combinación y complementarias adecuadas.

Dosis eficaces

Los anticuerpos anti-PG de la presente exposición, o composiciones de los mismos, generalmente se utilizan en una cantidad eficaz para conseguir el resultado deseado, por ejemplo una cantidad eficaz para tratar el cáncer de hígado en un sujeto con cáncer de hígado, o una cantidad eficaz para prevenir la recurrencia en un sujeto en riesgo de recurrencia de cáncer de hígado. Una cantidad eficaz es una cantidad que confiere un beneficio terapéutico.

En el contexto de los métodos de tratamiento de un cáncer de hígado, un beneficio terapéutico se refiere a cualquier tendencia a tratar parcial o completamente el cáncer de hígado. El beneficio terapéutico puede ponerse de manifiesto en cualquiera de los siguientes, individualmente o en combinación: reducción del tamaño, número o morfología (por ejemplo, encapsulado frente a invasivo) de los tumores hepáticos; eliminación de tumores hepáticos; reducción de la gravedad del cáncer de hígado; inducción de la remisión del cáncer de hígado; detención o retraso del agravamiento de los síntomas o signos asociados al cáncer de hígado; incremento del nivel de confort del paciente, reducción del dolor del paciente, reducción o eliminación del número de células de población secundaria, de las células de cáncer de hígado portadoras de uno o más de los marcadores de superficie celular CD133, CD44 o CD90 o de las células madre de cáncer de hígado, o reducción de la concentración sanguínea de PG en el sujeto con cáncer de hígado. El tamaño tumoral, el número y el metabolismo pueden medirse utilizando diversas técnicas de escaneo, tales como, aunque sin limitarse a ellas, TC, IRM, IRM funcional, SPECT y PET, así como otros métodos conocidos por el experto ordinario en la materia. Una cura completa, aunque deseable, no resulta necesaria para que exista beneficio terapéutico.

En el contexto de la prevención de la recurrencia del cáncer de hígado, un beneficio terapéutico se refiere a cualquier tendencia a prevenir parcial o completamente la reaparición o nuevo crecimiento de cáncer en el sujeto algún tiempo después de que el cáncer se ha vuelto indetectable. El beneficio terapéutico puede ponerse de manifiesto en cualquiera de los puntos siguientes, individualmente o en combinación: mantenimiento de la remisión del cáncer de hígado, incremento de la esperanza de vida del sujeto, retraso del crecimiento de los tumores hepáticos, inhibición del crecimiento de las células madre de cáncer de hígado, de células de población secundaria o de células e cáncer de hígado portadoras de uno o más de los marcadores de superficie celular CD133, CD44 o CD90; reducción o eliminación del número de células de población secundaria, de células de cáncer de hígado portadoras de uno o más de los marcadores de superficie celular CD133, CD44 o CD90 o células madre de cáncer de hígado.

En algunos contextos, el beneficio terapéutico puede correlacionar con uno o más puntos finales de sustitución, de acuerdo con los conocimientos del experto ordinario en la materia. A título de ejemplo no limitativo, pueden medirse las concentraciones plasmáticas y/o séricas de PG en un sujeto durante el tiempo, en donde una reducción de los niveles de PG o un nivel inferior a un nivel de umbral, por ejemplo inferior a aproximadamente 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM o 5 pM, es indicativo de beneficio terapéutico.

En otras formas de realización, el beneficio terapéutico de una composición de anticuerpos anti-PG puede determinarse a partir de su capacidad de matar las células madre de cáncer, de inhibir el crecimiento o proliferación de células madre de cáncer o de incrementar la apoptosis de las células madre de cáncer. Tal como se expone en otros lugares en la presente exposición, las células madre de cáncer de hígado pueden identificarse como presentando una o más características fenotípicas asociadas a las células madre de cáncer, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la expresión de determinados marcadores celulares, la capacidad de crecer como esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia y la capacidad de iniciar nuevo crecimiento tumoral después del trasplante.

La unión de la totalidad de la PG libre no resulta necesaria para conseguir la eficacia terapéutica. La PG libre se refiere a la PG que se encuentra disponible para la unión por un anticuerpo anti-PG. Por el contrario, la reducción de la concentración de PG libre dentro de un tumor, sistémicamente, en particular en líquidos corporales, o en otros sitios, en un grado más limitado asimismo puede resultar eficaz. Entre los tejidos y líquidos corporales

ejemplificativos en los que la concentración de PG libre puede reducirse mediante la administración de las composiciones de anticuerpos anti-PG indicadas en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, biopsia de cáncer extraída de un paciente, líquido ascítico, líquido de efusiones pleurales, líquido cerebroespinal, linfa, sangre, plasma, suero y otros. La concentración de PG en uno o más de dichos tejidos o líquidos corporales puede cuantificarse utilizando una técnica ELISA u otras técnicas familiares para el experto ordinario en la materia.

De acuerdo con los conocimientos del experto ordinario en la materia, la dosis de un anticuerpo anti-PG puede titularse en un paciente para reducir la concentración de PG libre en un tejido o líquido corporal de interés en un tiempo predeterminado después de la administración de por lo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% o de aproximadamente 5%-10%, aproximadamente 10%-15%, aproximadamente 15%-20%, aproximadamente 20%-25%, aproximadamente 25%-30%, aproximadamente 30%-35%, aproximadamente 35%-40%, aproximadamente 40%-45%, aproximadamente 45%-50%, aproximadamente 50%-55%, aproximadamente 55%-60%, aproximadamente 60%-65%, aproximadamente 65%-70%, aproximadamente 70%-75%, aproximadamente 75%-80%, aproximadamente 80%-85%, aproximadamente 85%-90%, o aproximadamente 90%-95%, o una reducción porcentual de concentración de PG libre entre cualquiera de los valores anteriores.

Las composiciones que comprenden anticuerpos anti-PG pueden administrarse en individuos (por ejemplo, sujetos humanos) a dosis eficaces. La cantidad de anticuerpo anti-PG administrado dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el tamaño y peso de los pacientes que deben tratarse, la forma, vía y sitio de administración, el régimen de tratamiento (por ejemplo, en el caso de que se utilice un segundo agente terapéutico), la edad y estado del sujeto particular bajo tratamiento, la sensibilidad del individuo a los anticuerpos anti-PG. La dosis apropiada podrá ser fácilmente determinada por el experto en la materia. Finalmente, el médico determinar las dosis apropiadas que deben utilizarse. Dicha dosis puede repetirse con la frecuencia apropiada. En el caso de que se desarrollen efectos secundarios, la cantidad y/o la frecuencia de la dosis pueden alterarse o reducirse, de acuerdo con la práctica clínica habitual. La dosis y régimen de tratamiento apropiados pueden establecerse mediante monitorización del progreso del tratamiento utilizando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia.

Las dosis eficaces pueden estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede formularse una dosis inicial para la utilización en animales para conseguir una concentración en sangre circulante o suero de anticuerpo anti-PG que es igual o superior a la afinidad de unión del anticuerpo de la progastrina según medición *in vitro*. El cálculo de las dosis para conseguir dichas concentraciones en sangre circulante o suero considerando la biodisponibilidad del anticuerpo particular se encuentra perfectamente comprendido en las capacidades del experto en la materia. Para una guía, se remite al lector a Fingl y Woodbury, "General Principles", en: Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, capítulo 1, última edición, Pagamonon Press, y las referencias citadas en esta obra.

Las dosis iniciales pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, tal como de modelos animales. Los modelos animales útiles para someter a ensayo la eficacia y seguridad de compuestos para el tratamiento del cáncer de hígado son conocidos de la técnica, tales como, aunque sin limitación, xenoinjertos de células de carcinoma hepatocelular humano en ratones u otros animales. El experto ordinario en la materia podrá adaptar rutinariamente dicha información para determinar las dosis adecuadas para la administración en el ser humano.

En formas de realización específicas, puede determinarse una dosis intravenosa para un sujeto individual mediante la medición de la concentración en suero o plasma de PG del individuo unas cuantas veces en unos cuantos días a unas cuantas semanas antes del tratamiento, y el cálculo de la cantidad de anticuerpo anti-PG que resultaría saturante, es decir, una cantidad que resultaría suficiente para unirse a la totalidad de la PG. Tal como apreciará el experto en la materia, la cantidad de cualquier anticuerpo necesario para conseguir la saturación para una concentración de suero o plasma dada de PG dependerá, en parte, de la constante de afinidad del anticuerpo particular. Los métodos para calcular las cantidades saturantes para anticuerpos anti-PG específicos de interés son bien conocidos.

Para garantizar la saturación, puede administrarse una cantidad que sea superior a la cantidad saturante calculada, por ejemplo puede administrarse una cantidad por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10 veces superior a la cantidad saturante calculada. Para los modos de administración diferentes de la vía i.v., la cantidad puede ajustarse basándose en la farmacocinética y la biodisponibilidad, tal como es bien conocido de la técnica.

La dosis eficaz de un anticuerpo anti-PG de la exposición puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 0.0001 y aproximadamente 250 mg/kg en cada administración (por ejemplo, bolo), múltiples administraciones o administración continua (por ejemplo, infusión), o para conseguir una concentración sérica de 0.01 a 5000 µg/ml de concentración sérica por cada administración, múltiples administraciones o administración continua, o cualquier intervalo o valor eficaz entre dichos valores, dependiendo de la condición bajo tratamiento, la vía de administración y la edad, peso y condición del sujeto. En determinadas formas de realización, cada dosis puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 0.1 mg/kg y aproximadamente 0.5 mg/kg; entre aproximadamente 0.25 mg/kg y aproximadamente 0.75 mg/kg; entre aproximadamente 0.5 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg; entre

aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 2 mg/kg; entre aproximadamente 1.5 mg/kg y aproximadamente 2.5 mg/kg; entre aproximadamente 2 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg; entre aproximadamente 2.5 mg/kg y aproximadamente 3.5 mg/kg; entre aproximadamente 3 mg/kg y aproximadamente 4 mg/kg; entre aproximadamente 3.5 mg/kg y aproximadamente 4.5 mg/kg; entre aproximadamente 4 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg; entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 7 mg/kg; entre aproximadamente 6 mg/kg y aproximadamente 8 mg/kg; entre aproximadamente 7 mg/kg y aproximadamente 9 mg/kg; entre aproximadamente 8 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg; entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg; entre aproximadamente 12.5 mg/kg y aproximadamente 17.5 mg/kg; entre aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg; entre aproximadamente 17.5 mg/kg y aproximadamente 22.5 mg/kg; entre aproximadamente 20 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg; entre aproximadamente 22.5 mg/kg y aproximadamente 27.5 mg/kg; entre aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg; entre aproximadamente 30 mg/kg y aproximadamente 40 mg/kg; entre aproximadamente 35 mg/kg y aproximadamente 45 mg/kg; entre aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg; entre aproximadamente 45 mg/kg y aproximadamente 55 mg/kg; entre aproximadamente 50 mg/kg y aproximadamente 60 mg/kg; entre aproximadamente 55 mg/kg y aproximadamente 65 mg/kg; entre aproximadamente 60 mg/kg y aproximadamente 70 mg/kg; entre aproximadamente 65 mg/kg y aproximadamente 75 mg/kg. Otros intervalos de dosis asimismo resultan posibles.

La cantidad, frecuencia y duración de la administración dependerá de una diversidad de factores, tales como la edad, peso y condición de la enfermedad del paciente. El tratamiento anti-PG está indicado en sujetos con cáncer de hígado, incluyendo CHC y hepatoblastoma, primario o recurrente. El tratamiento está indicado en cualquier estadio del cáncer de hígado, y especialmente en individuos para los que el trasplante o la resección quirúrgica no se encuentra disponible o está contraindicada.

Un régimen de tratamiento para la administración puede continuar durante 1 día o más, 2 días o más, 3 días o más, 4 días o más, 5 días o más, 6 días o más, 1 semana o más, 2 semanas a indefinidamente, durante 2 semanas a 6 meses, durante 3 meses a 5 años, de 6 meses a 1 o 2 años, de 8 meses a 18 meses, o similares. Opcionalmente, el régimen de tratamiento proporciona la administración repetida, por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, cada dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas o un mes. La administración repetida puede ser a la misma dosis o a una dosis diferente. La administración puede repetirse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o más. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo anti-PG en forma de una dosis individual 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 tiempo.

Métodos de monitorización de la eficacia del tratamiento

La presente exposición proporciona además métodos de monitorización de un sujeto bajo tratamiento con un anticuerpo anti-PG para determinar si el tratamiento resulta eficaz. El nivel de PG puede medirse en el paciente que recibe tratamiento anti-PG y utilizarse como una indicación de si el tratamiento resulta eficaz basándose en si el nivel medido es superior o inferior a un nivel basal de PG. Dicha información puede ser utilizada por los profesionales sanitarios para decidir si continuar administrando un anticuerpo anti-PG o modificar el tratamiento. Dichos métodos pueden utilizarse para monitorizar el tratamiento anti-PG, utilizado por sí solo, o en combinación con otros tratamientos, tal como se ha indicado anteriormente.

Para los fines de monitorizar la eficacia de la terapia, pueden medirse los niveles de PG en sangre, plasma o suero en puntos temporales especificados. Una reducción de la concentración durante el tiempo, y/o un nivel medido inferior a un valor umbral en un punto temporal particular, es indicativo de eficacia. El valor umbral puede ser el expuesto anteriormente, o podría ser un valor específico del sujeto obtenido del sujeto bajo tratamiento antes de iniciar la terapia o en algún punto temprano durante una ronda de terapia.

Sin deseo de restringirse a ninguna teoría de funcionamiento en particular, se cree que a medida que el número y/o el tamaño de los tumores en un paciente se reducen como resultado de la ronda de terapia, asimismo cae la cantidad total de PG producida por los tumores. En contraste, la falta de cambio sustancial, o una elevación de los niveles de PG después de completar una ronda de terapia, podría indicar que la terapia no ha resultado eficaz. Dicha información puede ser utilizada por los profesionales sanitarios para decidir si debería iniciarse una nueva ronda de terapia.

Los niveles de PG pueden medirse utilizando técnicas que resultarán familiares para el experto ordinario en la materia, tales como, aunque sin limitación, RIA y ELISA. Los anticuerpos anti-hPG útiles para medir los niveles de PG en sujetos humanos se describen en una sección posterior. Se describen ejemplos de ensayos para medir los niveles de PG en el documento nº WO 2011/083089, Ejemplos 1 y 2.

En una forma de realización específica, pueden medirse los niveles de PG utilizando un ELISA de tipo sándwich con un anticuerpo anti-PG con diana en el extremo N-terminal de la progastrina y un segundo anticuerpo anti-PG con diana en el extremo C-terminal de la progastrina. Se describen anticuerpos anti-PG N-terminales y C-

terminales ejemplificativos para dicho ensayo de tipo sándwich en una sección posterior. En dicho ensayo, 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 anti-PG N-terminal o C-terminal "de captura". A continuación, se aplica una muestra de ensayo a la superficie, seguido de un periodo de incubación. A continuación, la superficie se lava y se aplica una solución que contiene un segundo anticuerpo anti-PG "de detección", en el que el anticuerpo de detección se une a un epítipo diferente de PG (por ejemplo, en el caso de que el anticuerpo de captura sea un anticuerpo anti-PG C-terminal, se utiliza un anticuerpo anti-PG N-terminal como el anticuerpo de detección, y viceversa). A continuación, se miden los niveles de PG directamente (en el caso de que, por ejemplo, el anticuerpo de detección se conjugue con un marcaje detectable) o indirectamente (mediante un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo anti-PG de detección). Para dicho ensayo, deberían utilizarse anticuerpos en exceso de manera que se una y cuantifique toda la PG. En el ejemplo 1 se proporciona un ensayo de tipo sándwich específico para medir los niveles plasmáticos y/o séricos de PG.

Pueden realizarse múltiples mediciones a diferentes intervalos y después representarse gráficamente para determinar si existe una tendencia. En algunas formas de realización, una reducción dependiente del tiempo de la concentración sanguínea de PG indica que el tratamiento para el cáncer de hígado resulta eficaz. En un ejemplo no limitativo, los niveles de PG pueden determinarse a intervalos semanales, mensuales o anuales, mientras el paciente está recibiendo anticuerpos anti-PG. Asimismo resultan posibles otros intervalos.

En una forma de realización que implica una ronda de terapia con un anticuerpo anti-PG, asimismo pueden realizarse una o más mediciones durante el curso de la terapia de manera que pueda estimarse el efecto de los anticuerpos sobre los niveles de PG. En otras formas de realización, en el caso de presencia de anticuerpos anti-PG residuales en el paciente durante el muestreo, los datos podrían mostrar la reducción de los niveles de PG, debido al secuestro de la misma por los anticuerpos, seguido de una elevación, a medida que dicho efecto disminuye, seguido de una caída posterior, en el caso de que el tratamiento resulte eficaz. En todavía otras formas de realización, pueden realizarse mediciones postterapia, después de que se estime que los anticuerpos anti-PG han sido lavados del paciente, de manera que la unión de PG a dichos anticuerpos no afecte a la exactitud de la medición de la concentración de PG.

En algunas formas de realización de los métodos, puede medirse el nivel de PG en uno o más líquidos corporales, tales como sangre completa, plasma o suero de un sujeto que está recibiendo tratamiento con anticuerpo anti-PG, y después compararlo con un nivel de línea base. Típicamente, el nivel de PG es la concentración de PG en la muestra, expresado en cantidades molares (M) o en moles/litro (moles/litro). Un nivel de PG superior al de la línea base es indicativo de falta de eficacia del tratamiento. Por el contrario, un nivel de PG igual o inferior al nivel de la línea base es indicativo de eficacia del tratamiento.

Pueden utilizarse diferentes líneas base frente con las que comparar los niveles de PG detectados en el paciente. El nivel de línea base puede ser un solo número o un intervalo de números. La línea base puede basarse en una o más mediciones realizadas en el paciente o basarse en mediciones de PG en muestras de una población de individuos. En algunas formas de realización de los métodos, la línea base es un nivel de PG del mismo paciente, obtenido en uno o más intervalos, por ejemplo antes de iniciar el tratamiento anti-PG, durante el curso del tratamiento o después de interrumpir el tratamiento. En algunas formas de realización, la línea base puede ser un nivel medio de PG en una población de individuos con características similares a las del individuo sometido a monitorización. Entre dichas características pueden incluirse, aunque sin limitación, sexo, edad, tipo y estadio del cáncer de hígado, historia quirúrgica, y tratamiento anti-PG u otro tratamiento. En algunas formas de realización, la línea base es un nivel específico de PG, tal como aproximadamente 50 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 2 pM, aproximadamente 1 pM o incluso menor. En algunas formas de realización, la línea base es un intervalo.

En otras formas de realización, la línea base puede establecerse a partir de los niveles medios de PG en una población de pacientes con características similares a las del individuo sometido a monitorización. Entre dichas características pueden incluirse, aunque sin limitación, sexo, edad, tipo de cáncer primario, exposición a determinados tipos de tratamiento, cualquier combinación de ellos, y otros. En todavía otras formas de realización, puede utilizarse más de una línea base en la monitorización de un paciente particular. Por ejemplo, puede utilizarse tanto una línea base específica del paciente, como una línea base derivada de una población.

En algunas formas de realización, en el caso de que la concentración media de PG en un paciente de cáncer anteriormente tratado se encuentre en el intervalo normal para la población relevante con la que se está comparando el paciente, y se mantenga estable, el paciente se puntuaría como no recurrente y, de esta manera, no requeriría un nuevo tratamiento. Por el contrario, en el caso de que se observe que la concentración de PG se eleva durante un periodo de tiempo en un paciente de cáncer anteriormente tratado, y en determinadas formas de realización, exceda un umbral derivado de datos poblacionales, el paciente podría puntuarse como posible caso de recurrencia, y de esta manera, podría ser un candidato para un nuevo tratamiento contra la recurrencia del cáncer.

Debido a que la ingestión de alimento habitualmente incrementa la síntesis y secreción de gastrina, asimismo puede causar incrementos transitorios de los niveles sanguíneos de PG, que podrían interferir con la medición exacta de los niveles de PG en los pacientes bajo monitorización. Para evitar dicho efecto, particularmente en el caso de que deba determinarse la concentración de PG en muestras de sangre, pueden obtenerse muestras del paciente después de un ayuno, o un periodo de tiempo suficiente después de una comida para que cualesquiera efectos transitorios sobre la concentración de PG hayan desaparecido.

Anticuerpos anti-PG

Los anticuerpos útiles en los métodos dados a conocer en la presente memoria son aquellos que se unen específicamente a progastrina humana, con preferencia a otros productos del gen de gastrina. En referencia a la figura 1, el gen de la gastrina se traduce en un polipéptido de 101 aminoácidos denominado preprogastrina, que contiene una secuencia de señal (subrayada) que se corta, dando lugar a la progastrina, un polipéptido de 80 aminoácidos. La progastrina, a su vez, es cortada, generando un producto de 34 aminoácidos, de secuencia correspondiente a los residuos 38 a 71 de la progastrina, que a continuación es extendida en su extremo carboxi-terminal con un residuo de glicina, generando G34 extendida con glicina ("G34-Gly"). Un producto secundario de dicho corte es un péptido de 6 aminoácidos, denominado péptido flanqueante C-terminal, o CTFP, que corresponde en secuencia a los residuos 75 a 80 de la progastrina. A continuación, G34-Gly es cortada adicionalmente, generando un polipéptido de 17 residuos correspondiente en secuencia a los residuos 55 a 71 de la progastrina y denominado G17-Gly. La eliminación de las glicinas C-terminales de G34-Gly y G17-Gly, seguido de la amidación C-terminal, proporciona G34 y G17, respectivamente, ambos amidados C-terminalmente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo es "altamente específico para" hPG o "se une de manera altamente específica" a hPG en el caso de que se una a progastrina de longitud completa, pero no se une en absoluto a CTFP, a gastrina amidada o a gastrina extendida con glicina, y es "específica para" hPG o "se une específicamente a" hPG en el caso de que muestre una unión por lo menos aproximadamente 5 veces superior a hPG que a CTFP y los demás productos del gen de gastrina, según mediciones en ensayos de unión estándares. Un ensayo de ELISA específico que puede utilizarse para evaluar la especificidad de un anticuerpo anti-hPG particular se proporciona en el ejemplo 2.

Dichos anticuerpos anti-hPG altamente específicos y/o específicos (denominados en la presente memoria "anticuerpos anti-hPG") pueden ser policlonales ("PAb anti-hPG") o monoclonales ("MAb anti-hPG"), aunque para usos terapéuticos y, en algunos casos, diagnósticos u otros usos *in vitro*, resultan preferidos los anticuerpos monoclonales.

El epítipo que se une a los anticuerpos anti-hPG no resulta crítico. Los anticuerpos anti-hPG útiles pueden unirse a una región N-terminal de hPG, una región C-terminal de hPG o a una región diferente de hPG. Recientemente se ha encontrado que, por lo menos para los anticuerpos anti-hPG monoclonales, la selección del antígeno utilizado para generar los anticuerpos anti-hPG puede resultar importante (ver los documentos WO 2011/045080 y US 2011/117.086). Tal como se da a conocer en los documentos WO 2011/045080 y US 2011/117.086, no todos los antígenos derivados de hPG estimulan la producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG bajo condiciones fisiológicas. En efecto, determinados antígenos que se han utilizado para generar con éxito anticuerpos anti-hPG policlonales, tales como hPG recombinante de longitud completa (ver, por ejemplo, el documento WO 08/076454 de Singh) y un péptido correspondiente a los últimos diez aminoácidos en el extremo C-terminal de hPG (ver el documento WO 07/135542 de Hollande *et al.*) no consiguieron generar anticuerpos monoclonales. Se han descrito otros anticuerpos monoclonales, aunque no está claro si estos anticuerpos se unen realmente a la progastrina (documento WO 2006/032980). Tal como se señala en los documentos WO 2011/045080 y US 2011/117.086, se han identificado secuencias N-terminales y C-terminales antigénicas dentro de la secuencia de hPG que pueden utilizarse para generar anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a hPG. Resulta interesante que la secuencia antigénica no necesita estar limitada a regiones de la secuencia de hPG que son únicas de la misma. Los antígenos peptídicos que presentan regiones de secuencia en común con otros productos del gen de gastrina, por ejemplo G17, G34 y CTFP, proporcionan anticuerpos monoclonales que no sólo se unen a hPG sino que se unen a la misma específicamente.

Los anticuerpos anti-hPG obtenibles utilizando un antígeno peptídico con una secuencia correspondiente a una región N-terminal de hPG y/o que se unen a una región N-terminal de hPG se denominan en la presente memoria "anticuerpos anti-hPG N-terminales". Una región antigénica ejemplificativa específica de hPG que puede utilizarse para construir un inmunógeno adecuado para obtener anticuerpos tanto policlonales como monoclonales que son específicos para hPG corresponde a los residuos 1 a 14 de hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEC ID nº 25). Se proporcionan inmunógenos ejemplificativos útiles para obtener anticuerpos anti-hPG N-terminales, así como secuencias de CDR y de V_H y V_L de anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales obtenidos con dichos inmunógenos ejemplificativos, en la TABLA 1A, a continuación, y en las secciones de Ejemplos:

TABLA 1A						
Anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales						
Inmunógeno	Híbrido (nº de depósito)	MAB	Secuencias murinas de CDR		Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L (proyectadas)
N1	43B9G11	MAB1				
N1	WE5H2G7	MAB2				
N2	6B5B11C10	MAB3	V _H CDR 1.3	GYFTSYW	(SEC ID nº 1)	
			V _H CDR 2.3	FYPGNSDS	(SEC ID nº 2)	hV _H .3 (SEC ID nº 21)
			V _H CDR 3.3	TRRDSPQY	(SEC ID nº 3)	
			V _L CDR 1.3	QSIHVSNGNTY	(SEC ID nº 4)	
			V _L CDR 2.3	KVS	(SEC ID nº 5)	hV _L .3 (SEC ID nº 22)
			V _L CDR 3.3	FQGSHPFT	(SEC ID nº 6)	
N2	20D2C3G2	MAB4	V _H CDR 1.4	GYTFSSW	(SEC ID nº 7)	
			V _H CDR 2.4	FLPGSGST	(SEC ID nº 8)	hV _H .4 (SEC ID nº 23)
			V _H CDR 3.4	ATDGNVDWFAY	(SEC ID nº 9)	
			V _L CDR 1.4	QSLVHSSGVTY	(SEC ID nº 10)	hV _L .4 (SEC ID nº 24)
			V _L CDR 2.4	KVS	(SEC ID nº 5)	
			V _L CDR 3.4	SQSTHVPPT	(SEC ID nº 11)	

(continuación)

TABLA 1A							
Anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales							
Inmunógeno	Hibridoma (nº de depósito)	MAb	Secuencias murinas de CDR	Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L (proyectadas)	Inmunógeno	Hibridoma (nº de depósito)
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAB15					
Inmunógeno	Hibridoma (nº de depósito)	MAB	Secuencias murinas de CDR			Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L (proyectadas)
N2	1E9D9B6	MAB16	V _H CDR 1.16	GYTFTSYY	(SEC ID nº 39)	mV _H .16 (SEC ID nº 61)	hV _H .16a (SEC ID nº 84)
			V _H CDR 2.16	INPSNGGT	(SEC ID nº 43)		hV _H .16b (SEC ID nº 86)
			V _H CDR 3.16	TRGGYYPFDY	(SEC ID nº 47)		hV _H .16c (SEC ID nº 88)
			V _L CDR 1.16	QSLDSDGKTY	(SEC ID nº 50)	mV _L .16 (SEC ID nº 65)	hV _L .16a (SEC ID nº 85)
			V _L CDR 2.16	LVS	(SEC ID nº 53)		hV _L .16b (SEC ID nº 87)
			V _L CDR 3.16	WQGTSPYT	(SEC ID nº 57)		hV _L .16c (SEC ID nº 89)
N2	1C8D10F5	MAB17					
N2	1A7C3F11	MAB18					
N2	1B3B4F11	MAB19	V _H CDR 1.19	GYSITSDYA	(SEC ID nº 40)	mV _H .19 (SEC ID nº 62)	hV _H .19a (SEC ID nº 90)

(continuación)

TABLA 1A						
Anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales						
Immunógeno	Hibridoma (n° de depósito)	MAb	Secuencias murinas de CDR	Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L	Immunógeno
			V _H CDR 2.19	ISFSGYT	(SEC ID n° 44)	hV _H .19b (SEC ID n° 92)
			V _H CDR 3.19	AREVNYGDSYHFDY	(SEC ID n° 48)	hV _H .19c (SEC ID n° 94)
			V _L CDR 1.19	SQHRITYT	(SEC ID n° 51)	hV _L .19a (SEC ID n° 91)
			V _L CDR 2.19	VKKDGS	(SEC ID n° 54)	hV _L .19b (SEC ID n° 93)
			V _L CDR 3.19	GVGDAIKGQSVFV	(SEC ID n° 58)	hV _L .19c (SEC ID n° 95)
N2	1C11F5E8	MAb20				
Immunógeno N1 = SWKPRSQPDAPLG-Ahx-Cys-BSA, asimismo representada como (SEC ID n° 25)-Ahx-Cys-BSA						
Immunógeno N2 = SWKPRSQPDAPLG-Ahx-Cys-KLH, asimismo representada como (SEC ID n° 25)-Ahx-Cys-KLH						
Immunógeno	Hibridoma (n° de depósito)	MAb	Secuencias murinas de CDR		Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L (proyectadas)
En la TABLA 1A, todas las secuencias de aminoácidos se representan utilizando una orientación N→C convencional. Para cada inmunógeno, se sintetizó el péptido progastrina con un conector C-terminal de un residuo ácido aminohexanoico (Ahx) seguido de un residuo de cisteína (Cys), que se conjugó a continuación con un portador de albúmina de suero bovino ("BSA") o hemocianina de lapa americana ("KLH") mediante el residuo conector de Cys.						

5 Los anticuerpos anti-hPG obtenibles utilizando un antígeno peptídico con una secuencia correspondiente a una región C-terminal de hPG y/o que se unen a una región C-terminal de hPG se denominan en la presente memoria "anticuerpos anti-hPG C-terminales". Una región antigénica ejemplificativa específica que puede utilizarse para construir un inmunógeno útil para obtener anticuerpos anti-hPG C-terminales tanto policlonales como monoclonales corresponde a los residuos 55 a 80 de hPG. QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN (SEC ID nº 27). Se proporcionan en la TABLA 1B, a continuación, y en la sección de Ejemplos, inmunógenos ejemplificativos que incluyen dicho antígeno útil para obtener anticuerpos anti-hPG C-terminales, así como secuencias de CDR y V_H y V_L de anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales obtenidos con dichos inmunógenos ejemplificativos.

TABLA 1B							
Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales							
Inmunógeno	Híbrido (nº de depósito)	MAb	Secuencias murinas de CDR		Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L (proyectadas)	
C1	1B4A11D11 (I-4371)	MAb5					
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6					
C1	1B11E4B11 (I-4373)	MAb7					
C1	1C10D3B9	MAb8	V _H CDR 1.8	GFTFTTYA	mV _H .8 (SEC ID nº 59)	hV _H .8a	(SEC ID nº 75)
			V _H CDR 2.8	ISSGGTYT		hV _H .8b	(SEC ID nº 77)
			V _H CDR 3.8	ATQGNYSLDF		hV _H .8c	(SEC ID nº 79)
			V _L CDR 1.8	KSLRHTKGITF	mV _L .8 (SEC ID nº 63)	hV _L .8a	(SEC ID nº 76)
			V _L CDR 2.8	QMS		hV _L .8b	(SEC ID nº 78)
			V _L CDR 3.8	AQNLELPLT		hV _L .8c	(SEC ID nº 76)
C1	1D8F5B3	MAb9					
C1	1E1C7B4	MAb10					
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11					
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12					

(continuación)

TABLA 1B						
Anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales						
Inmunógeno	Hibridoma (nº de depósito)	MAb	Secuencias murinas de CDR	Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L (proyectadas)	
C1	2C6C3C7	MAb13	V _H CDR 1.13 GFIFSSYG	(SEC ID nº 38)	mV _H .1 (SEC ID nº 60) 3	hV _H .13 a (SEC ID nº 80)
			V _H CDR 2.13 INTFGDRT	(SEC ID nº 42)		hV _H .13 b (SEC ID nº 82)
			V _H CDR 3.13 ARGTGTY	(SEC ID nº 46)		
			V _L CDR 1.13 QSLDSD GKTY	(SEC ID nº 50)	mV _L .1 (SEC ID nº 64) 3	hV _L .13 a (SEC ID nº 81)
			V _L CDR 2.13 LVS	(SEC ID nº 53)		hV _L .13 b (SEC ID nº 83)
			V _L CDR 3.13 WQGTHTF PQT	(SEC ID nº 56)		
C1	2H9F4B7	MAb14				
C2	1F11F5E10	MAb21				
C2	1F11F5G9	MAb22				
C2	1A11F2C9	MAb23				
Immunógeno C1 = KLH-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, asimismo representado como KLH-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº 27)						
Immunógeno C2 = DT-Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, asimismo representado como DT-Cys-Ahx-Ahx-(SEC ID nº 27)						
Inmunógeno	Hibridoma (nº de depósito)	MAb	Secuencias murinas de CDR	Secuencias murinas de V _H y V _L	Secuencias humanizadas de V _H y V _L (proyectadas)	
En la TABLA 1B, todas las secuencias de aminoácidos se representan utilizando una orientación N→C convencional. Para cada inmunógeno, se sintetizó el péptido progastrina con un conector N-terminal Ahx-Ahx-Cys, que se conjugó a continuación con un portador de albúmina de suero bovino ("KLH") o un portador de toxina diftérica ("DT") mediante el residuo conector de Cys.						

Los epítomos específicos unidos mediante los anticuerpos monoclonales anti-hPG ejemplificativos MAb1-MAb23 proporcionados en las TABLAS 1A y 1B se mapearon utilizando la técnica SPOT y el barrido de alaninas, tal como se describe en Laune *et al.*, J. Immunol. Methods 267:53-70, 2002 y Laune, J. Biol. Chem. 272:30937-30944, 1997, respectivamente (ver asimismo el Ejemplo 6 del documento WO 2011/045080).

En la técnica SPOT, se generaron secuencias peptídicas de 15 aminoácidos que comprendían un epítipo putativo y se aplicaron en puntos sobre una membrana de nitrocelulosa que a continuación se sondeó con el anticuerpo de ensayo para determinar la secuencia epitópica mínima reconocida por el anticuerpo. Se utilizó el barrido de alaninas para determinar los residuos dentro de un epítipo que eran cruciales para la unión de los anticuerpos. Cada residuo dentro de un epítipo putativo se mutó, uno a uno, a una alanina, y a continuación los péptidos que contenían alanina se sondearon con el anticuerpo de ensayo.

Los anticuerpos monoclonales anti-hPG N-terminales MAb1-4 y 15-20, los epítomos comprendían por lo menos las secuencias siguientes: DAPLG (SEC ID nº 28), PDAPLG (SEC ID nº 29), PRSQQPD (SEC ID nº 30), WKPRSQQPD (SEC ID nº 31), o WKPRSQQPDAPLG (SEC ID nº 32), tal como se muestra en la TABLA 2A, a continuación.

TABLA 2A		
MAb nº	antígeno peptídico de PG: SWKPRSQQPDAPLG	SEC ID nº
MAb2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb1	PDAPLG	29
MAb3	DAPLG	28
MAb17	WKPRSQQPD	31
MAb18	WKPRSQQPD	31
MAb19	WKPRSQQPD	31
MAb20	WKPRSQQPD	31
MAb15	PRSQQPD	30
MAb16	PRSQQPD	30

Para los anticuerpos monoclonales anti-hPG C-terminales MAb5-7, 9-12, 14 y 21-23, los epítomos comprendían por lo menos las secuencias siguientes: FGRR (SEC ID nº 33), MDFGR (SEC ID nº 34), AEDEN (SEC ID nº 35) y GWMDFGRR (SEC ID nº 36), tal como se muestra en la TABLA 2B, a continuación.

TABLA 2B		
MAb nº	antígeno peptídico de PG: QGPWLEEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN	SEC ID nº
MAb14	GWMDFGRR	36
MAb11	MDFGR	34
MAb5	FGRR	33
MAb6	FGRR	33
MAb7	FGRR	33
MAb9	FGRR	33
MAb10	FGRR..E	33
MAb12	FGRR	33
MAb23	AEDEN	35

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

Entre las formas de realización específicas de anticuerpos anti-PG N-terminales útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria se incluyen anticuerpos que unen a un epítipo que incluye los residuos 10 a 14 de hPG (SEC ID nº 28), los residuos 9 a 14 de hPG (SEC ID nº 29), los residuos 4 a 10 de hPG (SEC ID nº 30), los residuos 2 a 10 de hPG (SEC ID nº 31) o los residuos 2 a 14 de hPG (SEC ID nº 32).

Entre las formas de realización específicas de anticuerpos anti-PG C-terminales útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria se incluyen anticuerpos que se unen a un epítipo que incluye los residuos 71 a 74 de hPG (SEC ID nº 33), los residuos 69 a 73 de hPG (SEC ID nº 34), los residuos 76 a 80 de hPG (SEC ID nº 35) o los residuos 67 a 74 de hPG (SEC ID nº 36).

Los anticuerpos anti-hPG N-terminales y C-terminales útiles en los métodos y kits dados a conocer en la presente memoria además de los proporcionados en las TABLAS 1A y 1B pueden identificarse en ensayos de unión competitiva con MAb 1-23 ejemplificativos o con otros anticuerpos de referencia que se unen a epítomos N-

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

Tal como asimismo se informa en los documentos WO 2011/045080 y US 2011/117.086, no todos los anticuerpos anti-hPG, ni siquiera los que muestran un elevado grado de especificidad y afinidad para hPG, pueden neutralizar la actividad biológica de hPG. Por ejemplo, aunque MAb14 anti-hPG se une a hPG con una K_D de aproximadamente 6 pM, no inhibió el crecimiento de las células de cáncer colorrectal en un ensayo *in vitro*, mientras que otros anticuerpos monoclonales anti-hPG mostraron una actividad inhibidora significativa (ver, por ejemplo, el ejemplo 7 del documento WO 2011/045080). Aunque los anticuerpos tanto no neutralizadores como neutralizadores que se unen específicamente a hPG resultan útiles para los diversos métodos diagnósticos y de monitorización descritos en la presente memoria, los anticuerpos anti-hPG útiles para métodos terapéuticos deberían mostrar actividad neutralizadora.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo anti-hPG neutralizador" es un anticuerpo anti-hPG que proporciona una reducción estadísticamente significativa del número de células Huh7 vivas en una muestra de ensayo tratada con el anticuerpo anti-hPG en comparación con una muestra de control tratada con un anticuerpo no específico. Un ensayo específico para evaluar la capacidad de cualquier anticuerpo anti-hPG particular de neutralizar la hPG se describe en el ejemplo 3. Aquellos anticuerpos anti-hPG que muestran una reducción de por lo menos aproximadamente 50% en el número de células vivas en el presente ensayo se cree que resultan especialmente útiles en el tratamiento del cáncer de hígado, aunque los anticuerpos anti-hPG que muestran niveles más bajos de actividad neutralizadora, por ejemplo, una reducción estadísticamente significativa de 40%, 30%, 20%, 15% o incluso 10% del número de células vivas en dicho ensayo, se espera que proporcionen beneficios terapéuticos.

De acuerdo con lo anterior, en algunas formas de realización, por ejemplo en formas de realización terapéuticas, los anticuerpos anti-hPG útiles son neutralizadores. Tal como se da a conocer en los documentos WO 2011/045080 y US 2011/117.086, la capacidad de un anticuerpo monoclonal anti-hPG no es dependiente de los epítomos, ya que los anticuerpos monoclonales anti-hPG tanto N-terminales como C-terminales muestran actividad neutralizadora en ensayos con células de cáncer de hígado. De esta manera, en algunas formas de realización específicas, los anticuerpos anti-hPG neutralizadores son anticuerpos anti-hPG neutralizadores N-terminales. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-hPG neutralizadores son anticuerpos anti-hPG neutralizadores C-terminales.

La afinidad de cualquier anticuerpo anti-hPG específico no resulta crítica. Sin embargo, para algunos usos, los anticuerpos que muestran afinidades de por lo menos aproximadamente 1 μ M pueden resultar preferidos. Para usos terapéuticos, puede resultar deseable una afinidad de por lo menos aproximadamente 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM, o incluso superior. Las afinidades medidas de los anticuerpos monoclonales anti-hPG identificadas en las TABLAS 1A y 1B se encuentran comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-12} M, tal como se señal en la TABLA 3, a continuación:

TABLA 3	
MAb n°	Afinidad (K_D medida)
MAb1	2.5 μ M (2.5×10^{-6} M)
MAb2	185 nM (1.85×10^{-7} M)
MAb3	6.4 nM (6.4×10^{-9} M)
MAb4	3.5 nM (3.5×10^{-9} M)
MAb5	13 pM (1.30×10^{-11} M)
MAb6	0.6 nM (6.38×10^{-10} M)
MAb7	58 pM (5.84×10^{-11} M)
MAb8	0.1 nM (1.08×10^{-10} M)
MAb10	3.6 nM (3.62×10^{-9} M)
MAb11	0.3 nM (3.12×10^{-10} M)
MAb12	0.4 nM (4.43×10^{-10} M)
MAb13	0.6 nM (6.12×10^{-10} M)
MAb14	6.8 pM (6.86×10^{-12} M)
MAb15	0.2 nM (2.11×10^{-10} M)
MAb16	0.2 nM (2.78×10^{-10} M)
MAb17	8.3 nM (8.29×10^{-9} M)
MAb18	1.2 nM (1.24×10^{-9} M)
MAb19	0.7 nM (7.79×10^{-10} M)
MAb20	0.2 nM (2.47×10^{-10} M)
MAb21	3.9 nM (3.90×10^{-9} M)
MAb22	5 nM (4.94×10^{-9} M)
MAb23	0.4 μ M (3.99×10^{-7} M)

Un anticuerpo anti-PG monoclonal con una afinidad especialmente adecuada para una aplicación deseada

particular puede seleccionarse fácilmente de entre ellos, o generarse o diseñarse utilizando los diversos inmunógenos, secuencias de región determinante de complementariedad (CDR), secuencias de cadena pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) de anticuerpos anti-hPG indicados en la presente memoria. La afinidad de cualquier anticuerpo anti-PG monoclonal particular puede determinarse utilizando técnicas bien conocidas o indicadas en la presente memoria, tales como, por ejemplo, ELISA, calorimetría de titulación isotérmica (CTI), BIAcore o ensayos de polarización fluorescente. Se proporciona un ejemplo específico en el ejemplo 4.

Tal como se señala en las TABLAS 1A y 1B, se han identificado varios anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales y C-terminales. La totalidad de dichos anticuerpos es específica para hPG según medición mediante el ensayo indicado en el ejemplo 2 y, con la excepción de MAb14, la totalidad mostraba actividad neutralizadora en ensayos con células de cáncer colorrectal. La totalidad de los anticuerpos sometidos a ensayo con células de cáncer de hígado (MAb 3, 8, 13, 16 y 19) mostraba actividad neutralizadora. Varios de los hibridomas que resultan útiles para obtener los anticuerpos se depositaron el 6 de octubre de 2010 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia), de acuerdo con el Tratado de Budapest. Los nombres designados de los hibridomas productores de MAb1-23 anti-hPG y los números de registro de depósito de dichos hibridomas depositados se proporcionan en las TABLAS 1A y 1B. Además, para varios de los anticuerpos, se han determinado las secuencias de aminoácidos de sus cadenas pesadas variables (V_H), cadenas ligeras variables (V_L), regiones determinantes de complementariedad (CDR) de V_L y CDR de V_H . Dichas secuencias de aminoácidos, y la nomenclatura abreviada utilizada para hacer referencia a las mismas en toda la exposición, asimismo se proporcionan en las TABLAS 1A y 1B. Brevemente, los dominios variables de cadenas pesada y ligera murinas se denominan en la presente memoria mV_H y mV_L seguido del número del anticuerpo monoclonal correspondiente, por ejemplo, $mV_H.3$ and $mV_L.3$ para las cadenas ligera variable y pesada variable del MAb3 anti-hPG, respectivamente. De manera similar, los dominios variables de cadenas pesada y ligera humanas se denominan en la presente memoria hV_H y hV_L seguido del número del anticuerpo monoclonal correspondiente. Las tres CDR de cadena pesada variable y las tres CDR de cadena ligera variable se denominan V_H CDR 1, 2 o 3, y V_L CDR 1, 2 o 3, respectivamente, seguido del número del anticuerpo anti-hPG monoclonal específico. Por ejemplo, V_H CDR 1 de MAb3 se denota como V_H CDR 1.3 y V_L CDR 1 de MAb3 se denota como V_L CDR 1.3. V_H CDR 2 de MAb3 se denota como V_H CDR 2.3, y V_L CDR 2 de MAb3 se denota como V_L CDR 2.3.

Se espera que las CDR correspondientes y/o las cadenas V_H y V_L de los anticuerpos anti-hPG monoclonales que se unen aproximadamente a los mismos epítomos podrían intercambiarse, proporcionando nuevos anticuerpos anti-hPG monoclonales útiles en los métodos y kits descritos en la presente memoria. Por ejemplo, tal como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos anti-hPG monoclonales ejemplificativos MAb5 y MAb6 se unen al mismo epítopo. Puede diseñarse un anticuerpo anti-hPG monoclonal que incluya en su cadena V_L , diversas combinaciones de las CDR de V_L de dichos dos anticuerpos, y/o en su cadena V_H , diversas combinaciones de las CDR de V_H de dichos dos anticuerpos. A título de ejemplo no limitativo específico para ilustrar las diversas combinaciones posibles, dicho anticuerpo podría incluir en su cadena V_L , las CDR 1 y 2 de MAb5 (V_L CDR 1.5 y V_L CDR 2.5, respectivamente) y CDR 3 de MAb6 (V_L CDR 3.6), y en su cadena V_H , CDR 1 de MAb6 (V_H CDR 1.6) y CDR 2 y 3 de MAb5 (V_H CDR 2.5 y V_H CDR 3.5, respectivamente). Las secuencias de aminoácidos de las CDR de los anticuerpos (asimismo conocidas como regiones hipervariables) producidas por hibridomas que se han depositado pueden obtenerse utilizando medios convencionales.

Tal como es conocido en la técnica, la posición/límite de aminoácido que define una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y de las diversas definiciones conocidas de la técnica. Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden considerarse posiciones hipervariables híbridas en el aspecto de que dichas posiciones pueden considerarse que se encuentran dentro de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios, mientras que se consideran fuera de una región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Una o más de dichas posiciones asimismo puede encontrarse en regiones hipervariables extendidas. Los anticuerpos anti-PG indicados en la presente memoria pueden contener modificaciones en dichas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden, cada uno, cuatro regiones FR, adoptando mayoritariamente una configuración de lámina β , conectada mediante tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen en estrecha proximidad gracias a las regiones FR en el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, MD, 1987). Tal como se utiliza en la presente memoria, la numeración de los residuos aminoácidos de la inmunoglobulina se lleva a cabo de acuerdo con el sistema de numeración de los residuos aminoácidos de la inmunoglobulina de Kabat *et al.*, a menos que se indique lo contrario.

En referencia a la TABLA 1A, entre las formas de realización específicas de anticuerpos anti-hPG N-terminales útiles en los métodos y kits indicados en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitación, las siguientes:

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

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

(c) anticuerpos en los que:

(i) V_L CDR 1 se selecciona de entre QSIHVSNGNTY ("V_L CDR 1.3"; SEC ID nº 4), QSLVHSSGVTY ("V_L CDR 1.4"; SEC ID nº 10), QSLDSDGKTY ("V_L CDR 1.16"; SEC ID nº 50) y SQHRTYT ("V_L CDR 1.19"; SEC ID nº 51),

(ii) V_L CDR 2 se selecciona de entre KVS ("V_L CDR 2.3" o "V_L CDR 2.4"; SEC ID nº 5), LVS ("V_L CDR 2.16"; SEC ID nº 53) y VKKDGSH ("V_L CDR 2.19"; SEC ID nº 54),

(iii) V_L CDR 3 se selecciona de entre FQGSHVPFT ("V_L CDR 3.3"; SEC ID nº 6), SQSTHVPPT ("V_L CDR 3.4"; SEC ID nº 11), WQGTHTSPYT ("V_L CDR 3.16"; SEC ID nº 57) y GVGDAIKGQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEC ID nº 58),

(iv) V_H CDR 1 se selecciona de entre GYIFTSYW ("V_H CDR 1.3"; SEC ID nº 1), GYTFSSSW ("V_H CDR 1.4"; SEC ID nº 7), GYTFTSY ("V_H CDR 1.16"; SEC ID nº 39) y GYSITSDYA ("V_H CDR 1.19"; SEC ID nº 40),

(v) V_H CDR 2 se selecciona de entre FYPGNSDS ("V_H CDR 2.3"; SEC ID nº 2), FLPGSGST ("V_H CDR 2.4"; SEC ID nº 8), INPSNGGT ("V_H CDR 2.16"; SEC ID nº 43) y ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEC ID nº 44), y

(vi) V_H CDR 3 se selecciona de entre TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEC ID nº 3), ATDGNYDWFAY ("V_H CDR 3.4"; SEC ID nº 9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEC ID nº 47) y AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEC ID nº 48),

(d) anticuerpos que presentan una V_L que corresponde en secuencia a la V_L de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20 y una V_H que corresponde en secuencia a la V_H de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20, y

(e) anticuerpos que presentan una V_L y una V_H que corresponde en secuencia a la V_L y V_H de MAb1, MAb2, MAb3, MAb4, MAb15, MAb16, MAb17, MAb18, MAb19 o MAb20.

En referencia a la TABLA 1B, entre las formas de realización específicas de anticuerpos anti-hPG C-terminales útiles en los métodos y kits indicados en la presente memoria se incluyen, aunque sin limitación, las siguientes:

(a) anticuerpos que presentan CDR de V_L que corresponden en secuencia a las CDR de V_L de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23 y CDR de V_H que corresponden a las secuencias de las CDR de V_H de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23,

(b) anticuerpos que presentan CDR de V_L y CDR de V_H que corresponden en secuencia a las CDR de V_L y V_H de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23,

(c) anticuerpos en los que:

(i) V_L CDR 1 se selecciona de entre KSLRHTKGITF ("V_L CDR 1.8"; SEC ID nº 49) y QSLDSDGKTY ("V_L CDR 1.13"; SEC ID nº 50),

(ii) V_L CDR 2 se selecciona de entre QMS ("V_L CDR 2.8"; SEC ID nº 52) y LVS ("V_L CDR 2.13"; SEC ID nº 53),

(iii) V_L CDR 3 se selecciona de entre AQNLELPLT ("V_L CDR 3.8"; SEC ID nº 55) y WQGTHTFPQT ("V_L CDR 3.13"; SEC ID nº 56),

(iv) V_H CDR 1 se selecciona de entre GFTFTTYA ("V_H CDR 1.8"; SEC ID nº 37) y GFIFSSYG ("V_H CDR 1.13"; SEC ID nº 38),

(v) V_H CDR 2 se selecciona de entre ISSGGTYT ("V_H CDR 2.8"; SEC ID nº 41) y INTFGDRT ("V_H CDR 2.13"; SEC ID nº 42), y

(vi) V_H CDR 3 se selecciona de entre ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEC ID nº 45) y ARGTGTY ("V_H CDR 3.13"; SEC ID nº 46),

(d) anticuerpos que presentan una V_L que corresponde en secuencia a la V_L de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23 y una V_H que corresponde en secuencia a la V_H de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23, y

(e) anticuerpos que presentan una V_L y una V_H que corresponde en secuencia a la V_L y V_H que corresponden en secuencia a la V_L y V_H de MAb5, MAb6, MAb7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb14, MAb21, MAb22 o MAb23.

Tal como apreciará el experto en la materia, los anticuerpos anti-hPG útiles en los métodos diagnósticos pueden ser de cualquier origen, incluyendo, por ejemplo, de mamífero (por ejemplo, humano, de primate, roedor, cabra o conejo), de no mamífero o de naturaleza quimérica (derivados de más de una especie de origen). Los anticuerpos adecuados para los usos terapéuticos en animales, incluyendo seres humanos, se derivan preferentemente de la misma especie que se pretende tratar o han sido modificados o diseñados para ser no inmunogénicos o presentan una inmunogenicidad reducida en el animal bajo tratamiento. Una clase específica de anticuerpos anti-hPG útiles para usos terapéuticos en seres humanos es la clase anticuerpos humanizados, comentados en mayor detalle posteriormente. Los anticuerpos anti-hPG útiles en los métodos y kits indicados en la presente memoria asimismo pueden ser, o derivarse de, cualquier isotipo, incluyendo, por ejemplo, IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) o IgM. Los anticuerpos anti-hPG diseñados para usos terapéuticos preferentemente son de isotipo IgG.

En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-hPG útiles para los métodos terapéuticos indicados en la presente memoria son anticuerpos humanizados. En general, los anticuerpos humanizados comprenden sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones de marco corresponden a las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana y puede denominarse "injertada con CDR". El anticuerpo humanizado puede comprender además por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Los métodos para humanizar anticuerpos, incluyendo los métodos para el diseño de anticuerpos humanizados, son bien conocidos de la técnica. Ver, por ejemplo, Lefranc *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77, 2003; Lefranc *et al.*, Nucl. Acids Res. 37:D1006-1012, 2009; Lefranc, Mol. Biotechnol. 40: 101-111, 2008; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-7, 1988; patentes US nº 5.530.101, nº 5.585.089, nº 5.693.761, nº 5.693.762 y nº 6.180.370 de Queen *et al.*; patente nº EP239400; publicación de patente PCT WO 91/09967; patente US nº 5.225.539; patentes nº EP592106 y nº EP519596; Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498, 1991; Studnicka *et al.*, Prot. Eng. 7:805-814, 1994; Roguska *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973, 1994 y patente US nº 5.565.332.

Pueden obtenerse utilizando dichos métodos bien conocidos versiones humanizadas de anticuerpos que presentan secuencias de CDR correspondientes a las CDR de anticuerpos anti-hPG no humanos, incluyendo, a título de ejemplo no limitativo, los diversos anticuerpos anti-hPG monoclonales N-terminales proporcionados en la TABLA 1A y los diversos anticuerpos anti-hPG monoclonales C-terminales proporcionados en la TABLA 1B. En las TABLAS 1A y 1B se proporcionan secuencias proyectadas de cadenas V_L y V_H humanizadas de anticuerpos anti-hPG seleccionados. Entre los ejemplos específicos de anticuerpos humanizados se incluyen anticuerpos que comprenden:

- (a) tres CDR de V_L cualesquiera y tres CDR de V_H cualesquiera dadas a conocer en la presente memoria,
- (b) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID nº 21 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº 22,
- (c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEC ID nº 23 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEC ID nº 24,
- (d) una región variable de cadena pesada V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 75, nº 77 y nº 79, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 76 y nº 78,
- (e) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 80 y nº 82, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 81 y nº 83,
- (f) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de

entre el grupo que consiste en SEC ID nº 84, nº 86 y nº 88, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 85, nº 87 y nº 89, y

- 5 (g) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 90, nº 92 y nº 94, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 91, nº 93 y nº 95.

10 Tal como reconocerá el experto en la materia, pueden obtenerse fácilmente anticuerpos anti-hPG que presentan propiedades de unión específicas, tales como la capacidad de unirse a un epítipo de interés específico, mediante la utilización de los diversos antígenos e inmunógenos indicados en la presente memoria y la evaluación de su capacidad de competir para la unión de hPG con un anticuerpo de referencia de interés. Cualquiera de los anticuerpos anti-hPG indicados en la presente memoria puede utilizarse como anticuerpo de referencia en dicho ensayo de competición. Un ensayo específico que resulta útil para evaluar la capacidad de un anticuerpo de competir para la unión a hPG de un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado de interés se proporciona en el ejemplo 5.

20 Al llevar a cabo un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo anti-hPG de referencia y cualquier anticuerpo de ensayo (con independencia de la especie o el isotipo), puede marcarse en primer lugar la referencia con un marcaje detectable directamente, tal como, por ejemplo, un isótopo radiactivo o un fluoróforo, o indirectamente, tal como, por ejemplo, con biotina (detectable mediante la unión a estreptavidina marcada fluorescentemente) o un enzima (detectable mediante una reacción enzimática), para permitir la posterior identificación. En este caso, se incuban un anticuerpo anti-hPG de referencia marcado (a concentraciones fijas o crecientes) con una cantidad conocida de hPG, formando un complejo de hPG:anticuerpo anti-hPG marcado. A continuación, el anticuerpo de ensayo no marcado se añade al complejo. Se mide la intensidad del marcaje en el complejo. En el caso de que el anticuerpo de ensayo compita con el anticuerpo anti-hPG de referencia marcado para hPG mediante la unión a un epítipo solapante, disminuirá la intensidad del marcaje del complejo respecto a un experimento de control llevado a cabo en ausencia del anticuerpo de ensayo.

30 Se conocen numerosos métodos para llevar a cabo ensayos de unión competitiva y pueden adaptarse para proporcionar resultados comparables al ensayo descrito anteriormente y en el ejemplo 5.

35 Se considera que un anticuerpo compite para la unión de hPG a un anticuerpo anti-hPG de referencia, y de esta manera se considera que se une a aproximadamente el mismo epítipo o epítipo solapante de hPG como anticuerpo anti-hPG de referencia, en el caso de que reduzca la unión del anticuerpo anti-hPG de referencia a hPG en un ensayo de unión competitiva, y específicamente el ensayo de unión competitiva del Ejemplo 5, en por lo menos 50%, a una concentración de anticuerpo de ensayo comprendida en el intervalo de entre 0.01 y 100 µg/ml (por ejemplo, 0.01 µg/ml, 0.08 µg/ml, 0.4 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml o 100 µg/ml u otra concentración comprendida dentro del intervalo indicado), aunque pueden resultar deseables niveles más elevados de reducción, por ejemplo de 60%, 70%, 80%, 90% o incluso de 100%.

45 El experto en la materia apreciará que, en algunos contextos, por ejemplo en contextos diagnósticos y de monitorización, puede resultar deseable marcar los anticuerpos anti-PG. Dichos marcajes resultan útiles para la detección y cuantificación. Los marcajes adecuados son bien conocidos de la técnica y pueden ser "directos" en el aspecto de que son directamente observables o detectables (por ejemplo, fluoróforos o isótopos radioactivos) o "indirectos", en el aspecto de que interactúan con otra cosa que produce una señal observable o detectable (por ejemplo, un enzima que actúa sobre un sustrato, produciendo una señal detectable, o una molécula de unión, tal como biotina, que se une a una molécula de estreptavidina marcada). Se conocen en la técnica y se contemplan para la utilización en la presente memoria numerosos sistemas de marcaje, así como medios de marcaje de anticuerpos con ellos.

55 Aunque los diversos anticuerpos anti-hPG útiles en los métodos indicados en la presente memoria se han ejemplificado con anticuerpos de longitud completa, el experto en la materia apreciará que asimismo pueden utilizarse fragmentos de unión o anticuerpos sustitutivos diseñados o derivado de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión. Entre los fragmentos, sustitutivos, etc. adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fab, Fv, vIgG, scFv y cuerpos sustitutivos. A menos que se especifique lo contrario, el término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria pretende incluir todas las formas de los anticuerpos y moléculas sustitutivas "de tipo anticuerpo", incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, cuerpos sustitutivos y fragmentos de unión. Los anticuerpos con estructuras típicas de anticuerpos naturales se denominan en la presente memoria "anticuerpos nativos".

Métodos de producción de anticuerpos anti-PG

Pueden obtenerse anticuerpos anti-PG útiles en los métodos indicados en la presente memoria utilizando métodos bien conocidos estándares. Para expresar anticuerpos anti-PG útiles en los métodos indicados en la presente memoria, se insertan ADN codificantes de cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa en vectores de expresión, de manera que los genes se ligan operablemente a secuencias de control transcripcional y traduccional. En el presente contexto, la expresión "operablemente ligado" pretende referirse a que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traduccional dentro del vector sirven a su función pretendida de regulación de la transcripción y regulación del gen de anticuerpo. El vector de expresión y secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión.

Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándares (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y en el vector, o mediante ligación de extremos romos en el caso de que no haya sitios de restricción presentes). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o pesada de anticuerpo anti-PG, el vector de expresión ya puede portar secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque de conversión de las secuencias de V_H y V_L del anticuerpo anti-PG en los genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión ya codificantes de las regiones constante de cadena pesada y constante de cadena ligera, respectivamente, de manera que el segmento V_H se encuentra operablemente ligado al segmento o segmentos C_H dentro del vector y el segmento V_L se encuentra operablemente ligado al segmento C_L dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido de señal se encuentre ligado en el mismo marco con el extremo aminoterminal del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal procedente de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la exposición portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en la célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, intensificadores 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. Se describen dichas secuencias reguladoras en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990. El experto en la materia apreciará que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de célula huésped que debe transformarse, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Entre las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión en una célula huésped de mamífero se incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión de proteínas en las células de mamífero, tales como promotores y/o intensificadores derivados del citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/intensificador del CMV), el virus 40 del simio (SV40) (tal como el promotor/intensificador de SV40), de adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP)) y del poliovirus. Para una descripción adicional de los elementos reguladores víricos, y secuencias de los mismos, ver, por ejemplo, la patente US nº 5.168.062, de Stinski; la patente US nº 4.510.245, de Bell *et al.*, y la patente US nº 4.968.615, de Schaffner *et al.*

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcador seleccionable. El gen de marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.399.216, nº 4.634.665 y nº 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen de marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, puromicina, blasticidina, higromicina o metotrexato, a una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Entre los genes de marcador seleccionable adecuados se incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para la utilización en células huésped DHFR⁻ con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418). Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el vector o vectores de expresión codificantes de las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" pretenden comprender una amplia diversidad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano, y similares.

Resulta posible expresar los anticuerpos indicados en la presente memoria en células huésped procarióticas o eucarióticas. En determinadas formas de realización, la expresión de anticuerpos se lleva a cabo en células eucarióticas, por ejemplo, células huésped de mamífero, para la secreción óptima de un anticuerpo correctamente plegado e inmunitariamente activo. Entre las células huésped de mamífero ejemplificativas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la exposición se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) (incluyendo células CHO DHFR⁻, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980, utilizadas con

un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, tal como se indica en Kaufman & Sharp, Mol. Biol. 159:601-621, 1982), células de mieloma NS0, células COS, células 293 y células SP2/0. En el caso de que se introduzcan vectores de expresión recombinante codificantes de genes de anticuerpo en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen mediante el cultivo de las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo mediante la utilización de métodos estándares de purificación de proteínas. Las células huésped asimismo pueden utilizarse para producir partes de anticuerpos intactos, tales como fragmentos F_{ab} o moléculas de scF_v . Se entiende que las variaciones del procedimiento anterior se encuentran comprendidas en el alcance de la presente exposición. Por ejemplo, puede resultar deseable transfectar una célula huésped con ADN codificante de la cadena ligera o la cadena pesada (aunque no ambas) de un anticuerpo anti-PG indicado en la presente memoria.

Asimismo puede utilizarse tecnología de ADN recombinante para eliminar parte o todo el ADN codificante de las cadenas ligeras o de las cadenas pesadas o de ambas que no resulta necesario para la unión a la PG. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncado asimismo resultan útiles en los métodos indicados en la presente memoria.

Para la expresión recombinante de un anticuerpo anti-PG, la célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, en el que el primer vector codifica un polipéptido derivado de una cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de una cadena ligera. Típicamente, cada uno de los dos vectores contiene un marcador seleccionable separado. Alternativamente, puede utilizarse un único vector que codifique polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera.

Asimismo pueden producirse anticuerpos anti-PG mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2a ed., The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill, 1984). Asimismo pueden generarse anticuerpos variantes utilizando una plataforma sin células (ver, por ejemplo, Chu *et al.*, Biochemia n° 2 (Roche Molecular Biologicals), 2001).

Una vez se ha producido un anticuerpo anti-PG mediante expresión recombinante o medios sintéticos, puede purificarse mediante cualquier método conocido de la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente mediante afinidad para PF tras la selección con proteína A o proteína G, y cromatografía de columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos anti-PG o fragmentos de unión de los mismos pueden fusionarse con secuencias de polipéptido heterólogo indicadas en la presente memoria o de otro modo conocidas de la técnica a fin de facilitar la purificación.

Ejemplos

Ejemplo 1: cuantificación de niveles plasmáticos o séricos de PG

Los niveles plasmáticos y/o séricos de PG pueden determinarse convenientemente utilizando el ensayo siguiente. Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con 0.5 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-hPG C-terminal, por ejemplo, un anticuerpo anti-hPG policlonal C-terminal de conejo o un anticuerpo anti-hPG C-terminal indicado en la presente memoria, y después se incubaron durante la noche. A continuación, las placas se lavaron tres veces en PBS-Tween (al 0.05%) y se bloquearon con leche seca desnatada al 2% (p/v) en PBS-Tween (al 0.05%). Por separado, se prepararon muestras de ensayo, muestras de control (muestras de plasma o suero de blanco o negativo para PG) y entre aproximadamente 5 pM (0.5×10^{-11} M) y aproximadamente 0.1 nM (1×10^{-10} M) de una hPG estándar de referencia (hPG liofilizada diluida en plasma o suero negativo para PG) en un diluyente apropiado (por ejemplo, PBS-Tween al 0.05%). Las muestras se incubaron sobre las placas recubiertas durante 2 a 4 horas a 37°C, o alternativamente durante 12 a 16 horas a 21°C. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween (al 0.05%) y se incubaron con 0.001 a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-hPG N-terminal, por ejemplo un anticuerpo anti-hPG policlonal N-terminal o un anticuerpo anti-hPG monoclonal N-terminal tal como se indica en la presente memoria, acoplado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (ver Nakane *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 22(12):1084-1091, 1974) durante 30 minutos a 21°C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween (al 0.05%) y se añadió sustrato de HRP durante 15 minutos a 21°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μl de ácido sulfúrico 0.5 M y se realizó una medición de densidad óptica a 405 nm. Se determinaron los niveles de hPG de la muestra de ensayo mediante comparación con una curva patrón construida a partir de las mediciones derivadas de la hPG estándar de referencia.

Ejemplo 2: ensayo ELISA para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-hPG

La especificidad de los anticuerpos anti-hPG puede determinarse convenientemente mediante la utilización de un ensayo de ELISA de la manera siguiente. Se incubaron placas de 96 pocillos durante la noche a 4°C con una o más 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 génicos derivados de gastrina) en solución salina tamponada con fosfato

(PBS), seguido del lavado de los pocillos tres veces con solución de lavado (PBS y Tween-20 al 0.1%) y después se incubaron durante 2 horas a 22°C con 100 µl de solución de bloqueo (PBS, Tween-20 al 0.1%, albúmina de suero bovino al 0.1% o hidrolizado de caseína) en cada pocillo. Tras el bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces y se añadió el anticuerpo que debía someterse a ensayo (anticuerpo de ensayo). Se añadieron 100 µl del anticuerpo de ensayo (a una concentración de 0.3 a 1 ng/ml) en PBS y Tween-20 al 0.1% a cada pocillo. A continuación, las placas se incubaron durante 2 horas a 22°C, seguido del descarte y sustitución de la solución de anticuerpo de ensayo, después de una etapa de lavado (3X 100 µl de solución de lavado, tal como se ha señalado anteriormente), con solución de bloqueo que contenía un anticuerpo secundario, un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (Fc) acoplado con peroxidasa de rábano picante. Tras una incubación de 1 hora con anticuerpo secundario, se añadieron 100 µl de solución de sustrato (por ejemplo, Fast OPD o dihidrocloruro de O-fenilendiamina, disponibles de Sigma-Aldrich Co., preparado siguiendo las instrucciones del fabricante) a cada pocillo y se incubaron en la oscuridad durante 20 minutos a 22°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 4 N y se determinó la cantidad de sustrato catalizada mediante la medición de la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. La conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario (de ensayo) unida al antígeno. Se llevaron a cabo experimentos por duplicado y las mediciones de D.O. se representaron gráficamente como función de la concentración de antígeno. Los anticuerpos de ensayo se puntuaron como específicos para hPG en el caso de que la D.O. medida se encontrase entre 0.2 y 1.5 para la hPG y no hubiese señal estadísticamente significativa superior al fondo de CTFP o cualquiera de los demás péptidos derivados de gen de gastrina, en el que el fondo era la señal media de los pocillos de control, que contenía únicamente PBS.

Ejemplo 3: ensayo para evaluar la actividad neutralizadora de los anticuerpos anti-hPG

Puede llevarse a cabo un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo anti-hPG particular es neutralizador, de la manera siguiente. Se sembraron células de carcinoma hepatocelular Huh7 en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (500 células/pocillo) en medio M11 sin suero. Las células se cultivaron a 37°C y se trataron dos veces diariamente durante 7 días con el anticuerpo anti-hPG de ensayo o un control, anticuerpo monoclonal no específico, a concentraciones de anticuerpo de aproximadamente 5 µg/ml. Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la mediana y la distribución de percentiles. Un anticuerpo de ensayo se define como neutralizador en el ensayo en el caso de que el número de esferoides formados por células Huh7 bajo condiciones de cultivo de baja adherencia muestre una reducción estadísticamente significativa de por lo menos 20% en comparación con las células tratadas con el anticuerpo de control, utilizando una prueba t no apareada al someter a ensayo un anticuerpo anti-hPG o un ANOVA unidireccional con pruebas post-hoc de Bonferroni al someter a ensayo múltiples anticuerpos (en las que una diferencia se consideraba significativa si $p < 0.05$).

Ejemplo 4: ensayo para evaluar la afinidad de un anticuerpo anti-hPG

Las constantes de afinidad de los anticuerpos anti-hPG pueden medirse utilizando la técnica Proteon (BioRad) según Nahshol *et al.*, Analytical Biochemistry 383:52-60, 2008. Brevemente, para los anticuerpos anti-PG murinos, en primer lugar, se recubrió un chip sensor con un anticuerpo anti-IgG de ratón (50 µg/ml), asegurándose de que la señal detectada por el chip después de la inyección del anticuerpo se encontrase comprendida entre 10.000 y 11.500 unidades de respuesta (UR). A continuación, se inyectó el anticuerpo anti-hPG murino de interés (anticuerpo de ensayo) (a una concentración típica de 30 µg/ml). En el caso de que el anticuerpo de ensayo se uniese suficientemente, se observará una señal adicional de por lo menos 500 UR. A continuación, se obtuvo un curso temporal de unión entre el anticuerpo de ensayo y la hPG mediante la inyección de concentraciones variables de hPG, por ejemplo 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM y 12.5 nM, y la detección del nivel de asociación. Típicamente, se encuentran disponibles varios canales para someter a ensayo múltiples anticuerpos en paralelo en un solo experimento, posibilitando someter a ensayo la unión de un único anticuerpo de ensayo a diferentes concentraciones de hPG en paralelo. Un canal debería inyectarse con un anticuerpo monoclonal murino que no es específico para hPG como control de unión no específica y debería inyectarse otro canal con tampón de dilución solo como línea base de la señal de fondo. Generalmente, ninguna unión es detectable en el canal inyectado con anticuerpo murino no específico. Los anticuerpos que muestran un nivel elevado de asociación en dicho contexto, que puede resultar en la saturación del anticuerpo monoclonal atrapado por la hPG, pueden someterse a ensayo frente a concentraciones de hPG inferiores (50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM y 3.125 nM), permitiendo una medición más refinada.

Se calcularon las constantes de afinidad (K_D) como la proporción entre la constante de disociación (k_d) y la constante de asociación (k_a). Los valores experimentales pueden validarse mediante el análisis de la similitud estadísticamente relevante entre las curvas experimentales basándose en las mediciones de unión y los perfiles teóricos.

Las constantes de afinidad de los anticuerpos anti-hPG no murinos pueden evaluarse en un formato similar mediante la utilización de una IgG específica para la especie de origen del anticuerpo de ensayo anti-hPG.

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

Un ensayo específico para evaluar si un anticuerpo de interés (anticuerpo de ensayo) compite para la unión a hPG con un anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado puede llevarse a cabo de la manera siguiente. Se recubrieron placas de 96 pocillos con un anticuerpo anti-hPG de captura o anticuerpo monoclonal que reconoce una región N-terminal o C-terminal de hPG que difiere del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), a una concentración que debe seleccionarse dentro del intervalo de 1 a 10 µg/ml, durante la noche a 4°C (0.1 a 1 µg/pocillo). Tras el bloqueo con tampón de bloqueo (Tween-20 al 0.1%, BSA al 0.1% en PBS) durante 2 h a 22°C, se añadió hPG recombinante a una concentración comprendida entre 10 pM y 1 nM (10 a 1000 pg/pocillo) y se incubó durante 2 h a 22°C. Después, se añadió el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado (o una mezcla que contenía el anticuerpo anti-hPG de referencia biotinilado), junto con concentraciones crecientes de anticuerpo de ensayo no marcado, y se incubó durante 1 h a 22°C. Tras el lavado para eliminar los anticuerpos no unidos, se llevó a cabo la detección del anticuerpo anti-hPG de referencia marcado unido mediante la incubación de la mezcla con 50 ng/ml de estreptavidina-hRP durante 1 h a 22°C, seguido de la incubación con un sustrato quimioluminiscente para peroxidasa de rábano picante durante 5 min a 22°C y después la cuantificación de las unidades lumínicas relativas (ULR) en un luminómetro. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

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

Se obtiene un valor de control elevado en un experimento de control llevado a cabo mediante la incubación del anticuerpo de referencia marcado con hPG recombinante sin anticuerpo de ensayo. Se obtiene un valor de control bajo en un experimento de control llevado a cabo mediante la incubación del anticuerpo de referencia marcado junto con hPG recombinante en presencia de concentraciones en exceso del anticuerpo de referencia no marcado (el anticuerpo de referencia no marcado de esta manera compite con el anticuerpo marcado para la unión a hPG). La capacidad de los anticuerpos de ensayo de competir con el anticuerpo anti-hPG de referencia se determina a continuación mediante incubación del anticuerpo de referencia marcado con hPG recombinante en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo de ensayo no marcado.

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

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

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

en la que " IC_{50} " es la concentración de anticuerpo de ensayo que proporciona una reducción de 50% de la unión del anticuerpo de referencia y $K_D^{\text{antic. anti-hPG de referencia}}$ es la constante de disociación del anticuerpo anti-hPG de referencia, una medida de su afinidad para hPG. Los anticuerpos de ensayo útiles que compiten con un anticuerpo anti-hPG de referencia (por ejemplo, uno de los anticuerpos anti-hPG indicados en la presente memoria) típicamente presentará K_i comprendidas entre 10 pM y 100 nM bajo las condiciones de ensayo indicadas en la presente memoria.

Ejemplo 6: los carcinomas hepatocelulares de tumores de cáncer de hígado muestran niveles elevados de expresión génica de GAST

El presente ejemplo describe la observación de que las muestras de tumor hepático de pacientes con carcinoma hepatocelular (CHC) expresan niveles elevados del gen GAST en comparación con el tejido normal.

A. Métodos

Se reseccionaron quirúrgicamente de 14 pacientes tumores hepáticos primarios y tejido de control normal. Se preparó ARN a partir de muestras de tejido hepático tanto tumoral como sano y se controló la integridad del ARNm utilizando un bioanalizador Agilent. Se midió la expresión de ARNm de GAST mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (RT-PCR) y se normalizó respecto a la expresión de ARNm de HPRT. Para la RT-PCR, se extrajo el ARN total de muestras de CHC utilizando el kit FastRNA Pro Green (MP BioMed) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN se transcribió inversamente utilizando Superscript II RT (Invitrogen) en presencia de cebador aleatorio (R&D Systems). Se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real utilizando el kit de PCR Quantifast SYBR Green (Qiagen) y el ciclador maestro Eppendorf ep realplex (Eppendorf). Se obtuvieron cebadores para la amplificación génica de GAST y HPRT de Sigma Life Science. Se llevó a cabo cada amplificación de PCR en pocillos por triplicado utilizando las condiciones siguientes: 5 min a 95°C seguido de un total de 45 ciclos de dos temperaturas (10 s a 95°C y 30 s a 60°C).

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 4, la expresión de ARNm de GAST se encontraba elevada en muestras de tumor CHC respecto al tejido hepático normal en 10 de 14 sujetos con cáncer hepático. En las muestras en las que la expresión de ARNm de GAST se encontraba elevada, la expresión era 2 a 2800 veces más elevada que en tejido normal.

Ejemplo 7: las líneas celulares de cáncer de hígado en cultivo bajo condiciones de cultivo de baja adherencia muestran niveles elevados de expresión génica de GAST

El presente ejemplo describe la observación de que las líneas celulares de cáncer de hígado bajo condiciones de cultivo de baja adherencia expresan niveles elevados del gen GAST respecto a la línea celular de cáncer colorrectal.

A. Métodos

Se sembraron dos líneas celulares de carcinoma hepatocelular, Huh7 y PLC/PRF/5, una línea celular de hepatoblastoma, Huh6, y una línea celular de cáncer colorrectal, SW480, cada una en matraces de adherencia ultrabaja en medio M11, y se cultivaron hasta conseguir la formación de esferas. A continuación, se procesaron las esferas para la extracción de ARN. Se llevó a cabo la RT-PCR tal como se indica en el ejemplo 1, con la excepción de que se extrajo el ARN total utilizando el minikit QIAGEN Rneasy siguiendo el protocolo del fabricante. Los niveles de expresión de ARNm de GAST de las líneas celulares de cáncer de hígado a continuación se normalizaron respecto a la expresión en células SW480, que sirvió como control positivo.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 5A-5B, todas las líneas celulares hepáticas sometidas a ensayo, Huh6, Huh7 y PLC/PRF/5, expresaban niveles elevados de ARNm de GAST en comparación con la línea celular de tumor colorrectal SW480 al cultivarla bajo condiciones de cultivo de baja adherencia. Los resultados se expresan respecto a los niveles de expresión génica de gastrina en células SW480.

Ejemplo 8: las células de población secundaria aisladas a partir de líneas celulares de cáncer de hígado y cultivadas bajo condiciones de cultivo de baja adherencia mostraban niveles elevados de expresión génica de GAST

El presente ejemplo describe la observación de que las células de "población secundaria" de exclusión de pigmento procedentes de dos líneas celulares de cáncer de hígado, Huh6 y Huh7, expresaban niveles elevados de ARNm de GAST en comparación con la población general de dichas células (es decir, población secundaria y población no secundaria) cultivadas bajo condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. Métodos

Las células de "población secundaria" de exclusión de pigmento de líneas celulares de cáncer de hígado Huh6 y Huh7 se aislaron a partir de la población de general de dichas células utilizando FACS. Específicamente, las células se disociaron mediante tratamiento con tripsina y EDTA. A continuación, las células se incubaron en 1 ml de medio de tinción (DMEM, suero de feto bovino al 2%, EDTA 2 mM) durante 10 min a 37°C. A una muestra de control negativo se le añadió 1 µl de solución de verapamilo 50 mM (concentración final: 50 µM). A continuación, se incubaron las muestras de control y de ensayo durante 10 min a 37°C. A continuación, se añadió solución de pigmento a las muestras de ensayo (2.5 µl de Hoechst 33342 2 mg/ml; concentración de pigmento final de 5 µg/ml), seguido de mezcla suave. A continuación, se incubaron todas las muestras durante 50 min a 37°C bajo mezcla suave regular. Tras la incubación sobre hielo durante 5 a 10 min, las muestras se centrifugaron a continuación durante 5 min a 1000 rpm. A continuación, los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de una dilución 1:40 de solución de yoduro de propidio 25 µg/ml en medio M11. Las células agregadas se separaron mediante filtración a través de un tamiz en un tubo de 5 ml. A continuación, las muestras se almacenaron sobre hielo hasta llevar a cabo la citometría utilizando un citómetro FACS Aria con detección de señal a 450 nm y a 488 nm. A continuación se purificó el ARN y se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm de GAST tal como en los Ejemplos 6 y 7 y después se compararon con los niveles de expresión génica de GAST de células Huh6 y Huh7 cultivadas en forma de esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia y con células de cáncer colorrectal SW480. Los niveles de expresión de ARNm de GAST de las líneas celulares de cáncer de hígado a continuación se normalizaron respecto a la expresión en células SW480, que sirvió como control positivo.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 6, la "población secundaria" de exclusión de pigmento de células Huh6 y Huh7 expresaba niveles elevados de ARNm de GAST en comparación con la población general de dichas células cultivadas como esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia (figuras 6A y 6B, respectivamente). La

población secundaria de células Huh7 expresaba más ARNm de gastrina que la población secundaria de células Huh6. Los resultados se expresan respecto a los niveles de expresión génica de GAST en células SW480.

Ejemplo 9: las células de carcinoma hepatocelular PLC/PRL/5 cultivadas bajo condiciones de crecimiento de esferoides forman menos esferoides al tratarlas con un anticuerpo anti-PG

El presente ejemplo muestra el efecto sobre el crecimiento como esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia de las células de cáncer de hígado PLC/PRL/5 del tratamiento con anticuerpos anti-hPG monoclonales.

A. Métodos

Se sembraron células de carcinoma hepatocelular PLC/PRL/5 en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (220 células/pocillo) en medio M11 sin suero (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Las células se cultivaron durante 10 días a 37°C con adición diaria de anticuerpos monoclonales MAb3 anti-hPG o de control (1 µg/ml). Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la media y la desviación estándar.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 7, el tratamiento con anticuerpos anti-hPG monoclonales de células PLC/PRF/5 redujo sustancialmente el número de esferoides que se formó durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con el anticuerpo monoclonal de control.

Ejemplo 10: las células de población secundaria purificadas a partir de la línea celular de hepatoblastoma Huh6 cultivadas bajo condiciones de crecimiento de esferoides forman menos esferoides al tratarlas con un anticuerpo anti-PG

El presente ejemplo muestra el efecto sobre el crecimiento como esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia de la población secundaria de exclusión de pigmento de células de cáncer de hígado Huh6 del tratamiento con anticuerpos anti-hPG policlonales.

A. Métodos

Las células de población secundaria de exclusión de pigmento Huh6 se aislaron tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, las células de población secundaria se sembraron en placas de 96 pocillos de adherencia ultrabaja (200 células/pocillo) en medio M11 y se cultivaron durante 13 días a 37°C en presencia de anticuerpos policlonales de control o antiprogastina (1 µg/ml), doxorubicina 5 nM (un agente quimioterápico utilizado en determinadas terapias del cáncer de hígado) o DMSO (vehículo para la doxorubicina) (15 pocillos para cada condición). La composición del medio M11 era la siguiente: DMEM/F12-Glutamax (nº de catálogo 31331, Invitrogen); 20 ng/ml de EGF (R&D systems); 10 ng/ml de FGF (R&D Systems); 20 µg/ml de insulina (Sigma); dilución 1/100 de suplemento N2 (nº de catálogo P1510, Gibco); 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa. Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la media y la desviación estándar.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 8, el tratamiento con anticuerpos anti-hPG policlonales de células de población secundaria purificadas a partir de la línea celular Huh6 redujo sustancialmente el número de esferoides que se formó durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con los anticuerpos de control, control de doxorubicina y DMSO.

Ejemplo 11: las células de población secundaria purificadas a partir de la línea hepatocelular Huh7 cultivadas bajo condiciones de crecimiento de esferoides forman menos esferoides al tratarlas con un anticuerpo anti-hPG

El presente ejemplo muestra el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-hPG policlonales sobre el crecimiento como esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia de la población secundaria de exclusión de pigmento de células de cáncer de hígado Huh7.

A. Métodos

Se aislaron las células de población secundaria de exclusión de pigmento Huh7 tal como se ha indicado en el ejemplo 8. A continuación, las células de población secundaria se sembraron en placas de 96 pocillos de adherencia ultrabaja (200 células/pocillo) en medio M11 y se cultivaron durante 9 días a 37°C en presencia de anticuerpos policlonales de control o antiprogastina (1 µg/ml), doxorubicina 5 nM (un agente quimioterápico

utilizado en determinadas terapias del cáncer de hígado) o DMSO (vehículo para la doxorrubicina) (15 pocillos para cada condición). La composición del medio M11 era la siguiente: DMEM/F12-Glutamax (nº de catálogo 31331, Invitrogen); 20 ng/ml de EGF (R&D Systems); 10 ng/ml de FGF (R&D Systems); 20 µg/ml de insulina (Sigma); dilución 1/100 de suplemento N2 (nº de catálogo P1510, Gibco); 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa. Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la media y la desviación estándar.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 9, el tratamiento con anticuerpos anti-hPG policlonales de células de población secundaria purificadas a partir de la línea celular Huh7 redujo el número de esferoides que se formó durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con los anticuerpos de control y el control de DMSO. Asimismo se observó que la doxorrubicina reducía el número de esferoides que se formaba en el cultivo.

Ejemplo 12: las células de hepatoblastoma Huh6 forman menos esferoides bajo condiciones de crecimiento de baja adherencia al tratarlas con un anticuerpo anti-hPG monoclonal

El presente ejemplo muestra el efecto de los anticuerpos anti-hPG monoclonales sobre el crecimiento de los esferoides Huh6 bajo condiciones de crecimiento de baja adherencia.

A. Métodos

Se sembraron células de hepatoblastoma Huh-6 en placas de 96 pocillos de adherencia ultrabaja (85 células/pocillo) en medio M11 sin suero (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Las células se trataron dos veces al día durante 7 días a 37°C con vehículo (PBS, control) o con anticuerpos anti-hPG monoclonales Mab13 o Mab19 (3 µg/ml). Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferoides en cada pocillo y se calculó y representó gráficamente la mediana y la distribución de percentiles.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 10, el tratamiento con anticuerpos anti-hPG monoclonales de células Huh6 redujo sustancialmente el número de esferoides que se formó durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con células de control no tratadas.

Ejemplo 13: las células Huh6 pretratadas con anticuerpos anti-hPG monoclonales forman menos esferoides al cultivarlas bajo condiciones de baja adherencia

El presente ejemplo demuestra el efecto inhibitor del pretratamiento con un anticuerpo anti-HPG monoclonal sobre la capacidad posterior de las células de hepatoblastoma Huh6 de crecer como esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. Métodos

En primer lugar, se sembraron 100,000 células de hepatoblastoma Huh6/pocillo en placas de 6 pocillos en DMEM con FCS al 10%, se sometieron a ayuno de suero durante la noche y se cultivaron durante 48 horas en DMEM en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo antiprogastina monoclonal MAb8 o MAb13 o un anticuerpo monoclonal de control (PCX63Ag8, ATCC, ref. nº TIB-9). Al final del tratamiento, para cada grupo de tratamiento, se sembraron 500 células/pocillo en ocho pocillos de placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja en 500 µl de medio M11 sin suero que contenía bFGF y EGF, y se cultivaron durante 5 días adicionales sin tratamiento. Al final de este periodo, se obtuvieron fotografías, se contó el número de esferas en cada pocillo y se midió la superficie de esfera. Se obtuvieron fotografías al final del periodo "de lavado" de 5 días, durante el que las células Huh-6 de todas las condiciones de tratamiento original se cultivaron en el mismo medio M11. Después, un operador ciego a la identidad de todos los pocillos, contó las esferas.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 11, la capacidad de las células de hepatoblastoma Huh6 de crecer como esferoides en placas de baja adherencia se redujo significativamente mediante el tratamiento anterior de 48 horas con un anticuerpo monoclonal contra progastina.

Ejemplo 14: las células de carcinoma hepatocelular Huh7 cultivadas bajo condiciones de crecimiento de esferoides forman menos esferoides al tratarlas con un anticuerpo anti-PG monoclonal

El presente ejemplo muestra el efecto de los anticuerpos anti-hPG monoclonales sobre la formación de esferoides de células Huh7 bajo condiciones de crecimiento de baja adherencia.

A. Métodos

En un primer experimento, se sembraron células de carcinoma hepatocelular Huh7 en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (500 células/pocillo) en medio M11 sin suero (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Las células se trataron dos veces al día durante 7 días a 37°C con vehículo (PBS, control) o con 3 µg/ml de anticuerpo anti-hPG monoclonal MAb13 (MAb13 anti-hPG). Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la mediana y la distribución de percentiles.

En un segundo experimento, se sembraron células de carcinoma hepatocelular Huh7 en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (500 células/pocillo) en medio M11 sin suero (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Las células se trataron dos veces diariamente durante 7 días a 37°C con 6 µg/ml de uno de entre: un anticuerpo monoclonal de control (MAb de control ((P3X63Ag8, ATCC, Ref. n° TIB-9), o anticuerpo monoclonal MAb13 anti-hPG o MAb16 anti-hPG). Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la mediana y la distribución de percentiles.

B. Resultados

En el primer experimento, se muestra en la figura 12A, el tratamiento de células Huh7 con anticuerpo anti-hPG monoclonal MAb13 redujo sustancialmente el número de esferoides que se formó durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con células de control no tratadas.

En el segundo experimento, tal como se muestra en la figura 12B, el tratamiento de las células Huh7 con anticuerpo anti-hPG monoclonal MAb13 o anticuerpo MAb16 redujo sustancialmente el número de esferoides que se formó durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con células tratadas con un anticuerpo monoclonal de control.

Ejemplo 15: las células de carcinoma hepatocelular Huh7 pretratadas con anticuerpos anti-hPG monoclonales forman menos esferoides al cultivarlas bajo condiciones de baja adherencia

El presente ejemplo demuestra el efecto inhibitor del pretratamiento con un anticuerpo antiprogastina monoclonal sobre la capacidad de las células de carcinoma hepatocelular Huh7 de formar esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. Métodos

En un experimento, en primer lugar se sembraron 75,000 células de carcinoma hepatocelular Huh7/pocillo en placas de 6 pocillos en MEMα con FCS al 10%, se sometieron a ayuno de suero durante la noche y se cultivaron durante 60 horas en MEMα + panexina H al 0.5% en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo antiprogastina monoclonal MAb8 o anticuerpo monoclonal de control (P3X63Ag8, ATCC, ref. n° TIB-9). Al final del tratamiento, para cada grupo de tratamiento, se sembraron 500 células/pocillo en ocho pocillos de placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja en 500 µl de medio M11 sin suero que contenía bFGF y EGF, y se cultivaron durante 5 días adicionales sin tratamiento. Al final de este periodo, se obtuvieron fotografías, se contó el número de esferas en cada pocillo y se midió la superficie de esfera. Se obtuvieron fotografías al final del periodo "de lavado" de 5 días, durante el que las células Huh-7 de todas las condiciones de tratamiento original se cultivaron en el mismo medio M11. Después, un operador ciego a la identidad de todos los pocillos, contó los esferoides.

En un segundo experimento, en primer lugar se sembraron 75,000 células de carcinoma hepatocelular Huh7/pocillo en placas de 6 pocillos en MEMα con FCS al 10%, se sometieron a ayuno de suero durante la noche y se cultivaron durante 60 horas en MEMα + panexina H al 0.5% en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo antiprogastina monoclonal MAb16 o un anticuerpo monoclonal de control (P3X63Ag8, ATCC, ref. n° TIB-9). Al final del tratamiento, para cada grupo de tratamiento, se sembraron 500 células/pocillo en ocho pocillos de placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja en 500 µl de medio M11 sin suero que contenía bFGF y EGF, y se cultivaron durante 5 días adicionales sin tratamiento. Al final de este periodo, se obtuvieron fotografías, se contó el número de esferas en cada pocillo y se midió la superficie de esfera. Se obtuvieron fotografías al final del periodo "de lavado" de 5 días, durante el que las células Huh-7 de todas las condiciones de tratamiento original se cultivaron en el mismo medio M11. Después, un operador ciego a la identidad de todos los pocillos, contó los esferoides.

B. Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 13A-B. Tal como se muestra en la figura 13A, la capacidad de las células Huh7 de crecer como esferoides en placas de baja adherencia se redujo significativamente mediante un pretratamiento de 48 horas con el anticuerpo anti-hPG MAb8. Tal como se muestra en la figura 13B, la capacidad de las células Huh7 de crecer como esferoides en placas de baja adherencia se redujo significativamente mediante un pretratamiento de 48 horas con el anticuerpo anti-hPG MAb16.

Ejemplo 16: Las células de "población secundaria" de carcinoma hepatocelular Huh7 forman menos esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia al tratarlas con un anticuerpo anti-PG

El presente ejemplo muestra el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-hPG monoclonales sobre el crecimiento como esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia de la "población secundaria" de exclusión de pigmento de células de la línea de cáncer de hígado Huh7.

A. Métodos

Se aislaron las células de población secundaria de exclusión de pigmento Huh7 tal como se ha indicado en el Ejemplo 8. A continuación, las células de población secundaria se sembraron en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (1000 células/pocillo) en medio M11 y se cultivaron durante 7 días a 37°C en presencia de medio de control o anticuerpo antiprogastina monoclonales MAb8 o MAb13 (6 µg/ml) (8 pocillos para cada condición). La composición del medio M11 era la siguiente: DMEM/F12-Glutamax (nº de catálogo 31331, Invitrogen); 20 ng/ml de EGF (R&D Systems); 10 ng/ml de FGF (R&D Systems); 20 µg/ml de insulina (Sigma); dilución 1/100 de suplemento N2 (nº de catálogo P1510, Gibco); 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa. Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la media y la desviación estándar.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 14, el tratamiento con anticuerpos anti-hPG monoclonales de células de población secundaria purificadas a partir de la línea celular Huh7 redujo sustancialmente el número de esferoides que se formó durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con células cultivadas en medio de control.

Ejemplo 17: las células de carcinoma hepatocelular PLC/PRL75 tratadas con un anticuerpo anti-PG forman menos esferoides bajo condiciones de crecimiento de baja adherencia

El presente ejemplo muestra el efecto de los anticuerpos anti-hPG monoclonales sobre la formación de esferoides de células PLC/PRL/5 bajo condiciones de crecimiento de baja adherencia.

A. Métodos

En un experimento, se sembraron células de carcinoma hepatocelular PLC/PRL/5 en placas de 96 pocillos de adherencia ultrabaja (35 células/pocillo) en medio M11 sin suero (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Las células se trataron dos veces diariamente durante 8 días a 37°C con 3 µg/ml de uno de entre: un anticuerpo monoclonal de control (MAb de control (P3X63Ag8, ATCC, Ref. nº TIB-9), o anticuerpo monoclonal MAb19 anti-hPG). Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la mediana y la distribución de percentiles.

En otro experimento, se sembraron células de carcinoma hepatocelular PLC/PRL/5 en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (200 células/pocillo) en medio M11 sin suero (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Las células se trataron dos veces diariamente durante 7 días a 37°C con 6 µg/ml de uno de entre: MAb de control o anticuerpo anti-hPG monoclonal MAb13). Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la mediana y la distribución de percentiles.

En un experimento adicional, se sembraron células de carcinoma hepatocelular PLC/PRL/5 en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (200 células/pocillo) en medio M11 sin suero (DMEM/F12 con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF, 20 µg/ml de insulina, suplemento N2, 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa). Las células se trataron dos veces diariamente durante 7 días a 37°C con 6 µg/ml de uno de entre: MAb de control, o anticuerpo monoclonal MAb8 anti-hPG o MAb13 anti-hPG. Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la mediana y la distribución de percentiles.

B. Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 15A-C. Tal como se muestra en la figura 15A, el tratamiento con anticuerpo anti-hPG MAb19 redujo significativamente el número de esferoides formados por las células PLC/PRL/5 durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con las células tratadas con MAb de control. Tal como se muestra en la figura 15B, el tratamiento con anticuerpo anti-hPG MAb13 redujo significativamente el número de esferoides formados por las células PLC/PRL/5 durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con las células tratadas con MAb de control. Tal como se muestra en la figura 15C, el tratamiento con anticuerpo anti-hPG MAb13 redujo significativamente el número de esferoides formados por las células PLC/PRL/5 durante el crecimiento bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con las células tratadas con MAb de control.

Ejemplo 18: las células PLC/PRF/5 pretratadas con anticuerpos anti-hPG monoclonales forman menos esferoides al cultivarlas bajo condiciones de baja adherencia

El presente ejemplo demuestra el efecto inhibitor del pretratamiento con anticuerpo anti-hPG monoclonal sobre la capacidad de las células de carcinoma hepatocelular de formar esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia.

A. Métodos

En primer lugar se sembraron 50,000 células de carcinoma hepatocelular PLC/PRF/5 en cada pocillo en placas de 6 pocillos en EMEM con FCS al 10%, se sometieron a ayuno de suero durante la noche y se cultivaron durante 72 horas en EMEM + panexina H al 0.5% en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo anti-hPG MAb8, anti-hPG MAb16 o un anticuerpo monoclonal de control (MAb de control, P3X63Ag8, ATCC, ref. n° TIB-9). Al final del tratamiento, para cada grupo de tratamiento, se sembraron 200 células/pocillo en ocho pocillos de placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja en 500 µl de medio M11 sin suero que contenía bFGF y EGF, y se cultivaron durante 5 días adicionales sin tratamiento. Al final de este periodo, se obtuvieron fotografías, se contó el número de esferas en cada pocillo y se midió la superficie de esfera. Se obtuvieron fotografías al final del periodo "de lavado" de 5 días, durante el que las células PLC/PRF/5 de todas las condiciones de tratamiento originales se cultivaron en el mismo medio M11. Después, un operador ciego a la identidad de todos los pocillos, contó los esferoides.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 16, la capacidad de las células de carcinoma hepatocelular PLC/PRF/5 de crecer como esferoides en placas de baja adherencia se redujo significativamente mediante el tratamiento anterior de 72 horas con dos anticuerpos monoclonales diferentes contra progastrina en comparación con MAb de control.

Ejemplo 19: las células de "población secundaria" de carcinoma hepatocelular PLC/PRL/5 forman menos esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia al tratarlas con un anticuerpo anti-PG

El presente ejemplo muestra el efecto de los anticuerpos anti-hPG monoclonales sobre la formación de esferoides bajo condiciones de cultivo de baja adherencia de la "población secundaria" de exclusión de pigmento aisladas a partir de células de cáncer de hígado PLC/PRL/5.

A. Métodos

Se aislaron las células de población secundaria de exclusión de pigmento PLC/PRL/5 tal como se ha indicado en el Ejemplo 8. A continuación, las células de población secundaria se sembraron en placas de 24 pocillos de adherencia ultrabaja (400 células/pocillo) en medio M11 y se cultivaron durante 7 días a 37°C en presencia de medio de control o anticuerpos monoclonales antiprogastrina MAb13 (6 µg/ml) o MAb16 (10 µg/ml) (6 pocillos para cada condición). La composición del medio M11 era la siguiente: DMEM/F12-Glutamax (n° de catálogo 31331, Invitrogen); 20 ng/ml de EGF (R&D Systems); 10 ng/ml de FGF (R&D Systems); 20 µg/ml de insulina (Sigma); dilución 1/100 de suplemento N2 (n° de catálogo P1510, Gibco); 2 µg/ml de ciprofloxacino, 5 µg/ml de gentamicina y 3 µg/ml de glucosa. Al final del experimento, se obtuvieron fotomicrografías y se contó el número de esferas en cada pocillo y se calculó la media y la desviación estándar.

B. Resultados

Tal como se muestra en la figura 17, el tratamiento de células de "población secundaria" aisladas a partir de la línea celular PLC/PRL/5 con anticuerpos monoclonales anti-hPG redujo sustancialmente el número de esferoides formado bajo condiciones de cultivo de baja adherencia en comparación con las células cultivadas en medio solo.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la progastrina humana (hPG) para la utilización en un método de tratamiento de cáncer de hígado o de prevención de la recurrencia de cáncer de hígado, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-hPG comprende CDR de V_L y V_H que presentan unas secuencias seleccionadas de entre uno de los grupos de secuencias de CDR de V_L y V_H siguientes:

- (i) V_H CDR1.3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1, V_H CDR 2.3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, V_H CDR 3.3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3, V_L CDR 1.3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4, V_L CDR 2.3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 5, y V_L CDR 3.3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6;
- (ii) V_H CDR1.8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 37, V_H CDR 2.8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 41, V_H CDR 3.8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 45, V_L CDR 1.8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 49, V_L CDR 2.8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 52, y V_L CDR 3.8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 55;
- (iii) V_H CDR 1.13 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 38, V_H CDR 2.13 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 42, V_H CDR 3.13 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 46, V_L CDR 1.13 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 50, V_L CDR 2.13 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 53, y V_L CDR 3.13 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 56;
- (iv) V_H CDR 1.16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 39, V_H CDR 2.16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 43, V_H CDR 3.16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 47, V_L CDR 1.16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 50, V_L CDR 2.16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 53, y V_L CDR 3.16 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 57;
- (v) V_H CDR 1.19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 40, V_H CDR 2.19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 44, V_H CDR 3.19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 48, V_L CDR 1.19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 51, V_L CDR 2.19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 54, y V_L CDR 3.19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 58.

2. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un humano.

3. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo antiprogastrina monoclonal se selecciona de entre el grupo que consiste en: anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos IgA1, anticuerpos IgA2, anticuerpos IgD, anticuerpos IgE, anticuerpos IgG1, anticuerpos IgG2, anticuerpos IgG3, anticuerpos IgG4 y anticuerpos IgM.

4. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo antiprogastrina monoclonal es un anticuerpo monoclonal humanizado.

5. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-hPG N-terminal comprende cadenas V_H y V_L que presentan unas secuencias seleccionadas de entre uno de los grupos de secuencias de V_H y V_L siguientes:

- (i) hV_H 3 (SEC ID nº 21) y hV_L 3 (SEC ID nº 22);
- (ii) hV_H 8a (SEC ID nº 75) y hV_L 8a (SEC ID nº 78);
- (iii) hV_H 8b (SEC ID nº 76) y hV_L 8b (SEC ID nº 79);
- (iv) hV_H 8c (SEC ID nº 77) y hV_L 8c (SEC ID nº 80);
- (v) hV_H 13a (SEC ID nº 80) y hV_L 13a (SEC ID nº 82); y
- (vi) hV_H 13b (SEC ID nº 81) y hV_L 13b (SEC ID nº 83);
- (vii) hV_H 16a (SEC ID nº 84) y hV_L 16a (SEC ID nº 85);
- (viii) hV_H 16b (SEC ID nº 86) y hV_L 16b (SEC ID nº 87);
- (ix) hV_H 16c (SEC ID nº 88) y hV_L 16c (SEC ID nº 89);
- (x) hV_H 19a (SEC ID nº 90) y hV_L 19a (SEC ID nº 91);
- (xi) hV_H 19b (SEC ID nº 92) y hV_L 19b (SEC ID nº 93); y
- (xii) hV_H 19c (SEC ID nº 94) y hV_L 19c (SEC ID nº 95).

6. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo antiprogastrina monoclonal se administra complementariamente a la resección quirúrgica o al tratamiento con un segundo agente.

5 7. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según la reivindicación 6, en el que dicho segundo agente es un agente quimioterápico, un agente de irradiación o un anticuerpo.

8. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según la reivindicación 7, en el que dicho agente quimioterápico se selecciona de entre 1-deshidrotestosterona, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleucina, agentes alquilantes, alopurinol sodio, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC), agentes antimitóticos, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, diamino dicloro platino, antraciclinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginasa, BCG viva (intravesical), fosfato de betametasona sódica y acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfán, leucouorina cálcica, caliqueamicina, capecitabina, carboplatino, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), clorambucilo, cisplatino, cladribina, colchicina, estrógenos conjugados, ciclofosfamida, ciclotosfamida, citarabina, citarabina, citocalasina B, citoxano, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), HCl de daunorrubicina, citrato de daunorrubicina, denileucina difitox, dexrazoxano, dibromomanitol, dihidroxi antracín diona, docetaxel, mesilato de dolasetrón, HCl de doxorubicina, dronabinol, L-asparaginasa de *E. coli*, emetina, epoyetina- α , L-asparaginasa de *Erwinia*, estrógenos esterificados, estradiol, estramustina fosfato sódico, bromuro de etidio, etinil estradiol, etidronato, factor de etopósido citrororum, fosfato de etopósido, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido folínico, HCl de gemcitabina, glucocorticoides, acetato de goserrelina, gramicidina D, HCl de granisetron, hidroxiurea, HCl de idarrubicina, ifosfamida, interferón α -2b, HCl de irinotecán, letrozol, leucovorina cálcica, acetato de leuprorrelina, HCl de levamisol, lidocaína, lomustina, maitansinoide, HCl de mecloretamina, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, HCl de melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octeótide, HCl de ondansetrón, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato disódico, pentostatina, HCl de pilocarpina, pirlimicina, polifeprosán 20 con implante de carmustina, porfímero sódico, procaína, HCl de procarbazona, propranolol, rituximab, sargramostim, sorafenib, estreptoizotocina, tamoxifeno, taxol, tegafur, tenipósido, tenopósido, testolactona, tetracaína, tiotepa clorambucilo, tioguanina, tiotepa, HCl de topotecán, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina.

9. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo se selecciona de entre rituximab, edrecolomab, cetuximab, panitumumab y bevacizumab.

10. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicho anticuerpo antiprogastrina monoclonal y dicho segundo agente se administran simultánea, sucesiva o separadamente.

11. Anticuerpo antiprogastrina monoclonal para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además la etapa de:

- medir los niveles de PG en sangre, plasma o suero en puntos temporales especificados, con un anticuerpo antiprogastrina monoclonal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,

en el que una reducción de dicho nivel de progastrina a lo largo del tiempo indica que el tratamiento es eficaz.

FIG. 1

Preprogastrina:	M	QRLCVYVLIF	ALALAAFSEA	SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LPLPWLEQQG
	-21	-11	-1	+1	11	21
		PASHHRRQLG	PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWM	FGRRSAEDEN
	31	41	51	61	71	
Progastrina:				SWKPRSQQPD	APLGTGANRD	LPLPWLEQQG
				+1	11	21
		PASHHRRQLG	PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWM	FGRRSAEDEN
	31	41	51	61	71	
G34:		QLG	PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWM	F-NH ₂
		41	51	61	71	
G34-Gly:		QLG	PQGPPHLVAD	PSKKQGPWLE	EEEEAYGWM	FG
		41	51	61	71	
G17:				QGPWLE	EEEEAYGWM	F-NH ₂
					61	71
G17-Gly:				QGPWLE	EEEEAYGWM	FG
					61	71
CTFP:						SAEDEN
						75

FIG. 2A

mV_H MAb3

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

FIG. 2B

mV_L MAb3

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

FIG. 2C

mV_H MAb4

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

FIG. 2D

mV_L MAb4

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

FIG. 2E

mV_H MAb8

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

FIG. 2F

mV_L MAb8

gac att gtg atg acg cag gct gca tcc tct aat cca gtc act ctt gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Ser Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly	
1 5 10 15	
aca tcc gct tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt ctc cga cat act	96
Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser 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	

FIG. 2G

mV_H MAb13

gag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gtg	cag	cct	gga	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
tcc	ctg	aaa	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	att	ttc	agt	agc	tat	96
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	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															

FIG. 2H

mV_L MAb13

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

FIG. 2I

mV_H MAb16

cag gtc caa ctg cag cag tct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct	48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc acc agc tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser 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	

FIG. 2J

mV_L MAb16

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

FIG. 2K

mV_H MAb19

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

FIG. 2L

mV_L MAb19

caa ctt gcg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc ctg gga gcc	48
Gln Leu Ala Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gca aaa cta acg tgc act ttg agt agt caa cac aga acg tac acc	96
Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser 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	

FIG. 3A

hV_H MAb3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala			
1				5					10					15				
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ile</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>			
			20					25						30				
<u>Trp</u>	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met			
		35					40					45						
Gly	Gly	<u>Phe</u>	<u>Tyr</u>	<u>Pro</u>	<u>Gly</u>	<u>Asn</u>	<u>Ser</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	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				
<u>Thr</u>	<u>Arg</u>	<u>Arg</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Gln</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr			
			100					105					110					
Val	Ser	Ser																
		115																

FIG. 3B

hV_L MAb3

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3C

hV_H MAbs

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 3D

hV_L MAb4

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3E

hV_H MAb8(a)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 3F

hV_L MAb8(a)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3G

hV_H MAb8(b)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 3H

hV_L MAb8(b)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 31

hV_H MAb8(c)

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 3J

hV_L MAb8(c)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3K

hV_H MAb13(a)

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr

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

<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
		100						105					110		

Ser Ser

FIG. 3L

hV_L MAb13(a)

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	<u>Gln</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>
			20					25					30		
<u>Asp</u>	<u>Gly</u>	<u>Lys</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Ser</u>	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	<u>Trp</u>	<u>Gln</u>	<u>Gly</u>
				85					90					95	
<u>Thr</u>	<u>His</u>	<u>Phe</u>	<u>Pro</u>	<u>Gln</u>	<u>Thr</u>	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

FIG. 3M

hV_H MAb13(b)

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

FIG. 3N

hV_L MAb13(b)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 30

hV_H MAb16(a)

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

FIG. 3P

hV_L MAb16(a)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3Q

hV_H MAb16(b)

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>
			20					25					30		
<u>Tyr</u>	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Ile	<u>Ile</u>	<u>Asn</u>	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	<u>Asn</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	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	
<u>Thr</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Tyr</u>	<u>Pro</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
				100				105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115											

FIG. 3R

hV_L MAb16(b)

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	<u>Gln</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>
			20					25					30		
<u>Asp</u>	<u>Gly</u>	<u>Lys</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Arg	Arg	Leu	Ile	Tyr	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Ser</u>	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	<u>Trp</u>	<u>Gln</u>	<u>Gly</u>
			85						90					95	
<u>Thr</u>	<u>His</u>	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

FIG. 3S

hV_H MAb16(c)

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	<u>Phe</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>
			20					25					30		
<u>Tyr</u>	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
	35						40					45			
Gly	Glu	<u>Ile</u>	<u>Asn</u>	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	<u>Asn</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	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	
<u>Thr</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Tyr</u>	<u>Pro</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr
				100				105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115											

FIG. 3T

hV_L MAb16(c)

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

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

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

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

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

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

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

FIG. 3U

hV_H MAb19(a)

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln			
1				5					10					15				
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ser</u>	<u>Ile</u>	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	<u>Asp</u>			
			20					25					30					
<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp			
		35					40					45						
Ile	Gly	Tyr	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Phe</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	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				
<u>Ala</u>	<u>Arg</u>	<u>Glu</u>	<u>Val</u>	<u>Asn</u>	<u>Tyr</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	<u>Ser</u>	<u>Tyr</u>	<u>His</u>	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	<u>Tyr</u>	Trp	Gly			
			100					105					110					
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115					120											

FIG. 3V

hV_L MAb19(a)

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
 115

FIG. 3W

hV_H MAb19(b)

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

FIG. 3X

hV_L MAb19(b)

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
 115

FIG. 3Y

hV_H MAb19(c)

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

FIG. 3Z

hV_L MAb19(c)

Gln	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Cys	Thr	Leu	Ser	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	<u>His</u>	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>	20	25	30	
Ile	Glu	Trp	His	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Lys	Gly	Pro	Arg	Tyr	Leu	Met	35	40	45	
Glu	<u>Val</u>	<u>Lys</u>	<u>Lys</u>	<u>Asp</u>	<u>Gly</u>	<u>Ser</u>	<u>His</u>	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	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Asp</u>	85	90	95	
<u>Ala</u>	<u>Ile</u>	<u>Lys</u>	<u>Gly</u>	<u>Gln</u>	<u>Ser</u>	<u>Val</u>	<u>Phe</u>	<u>Val</u>	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	100	105	110	
Glu	Ile	Lys														115			

FIG. 4

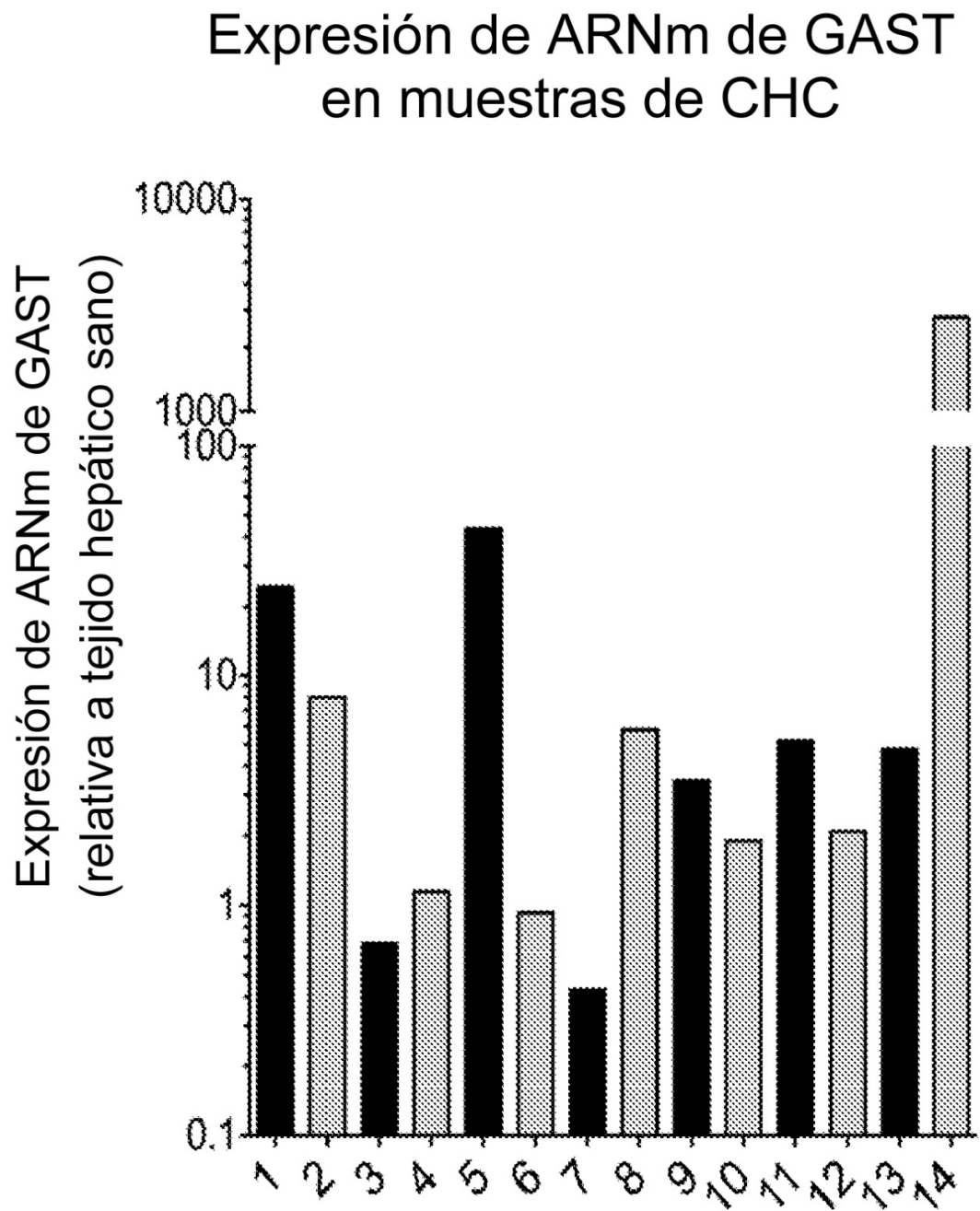


FIG. 5A

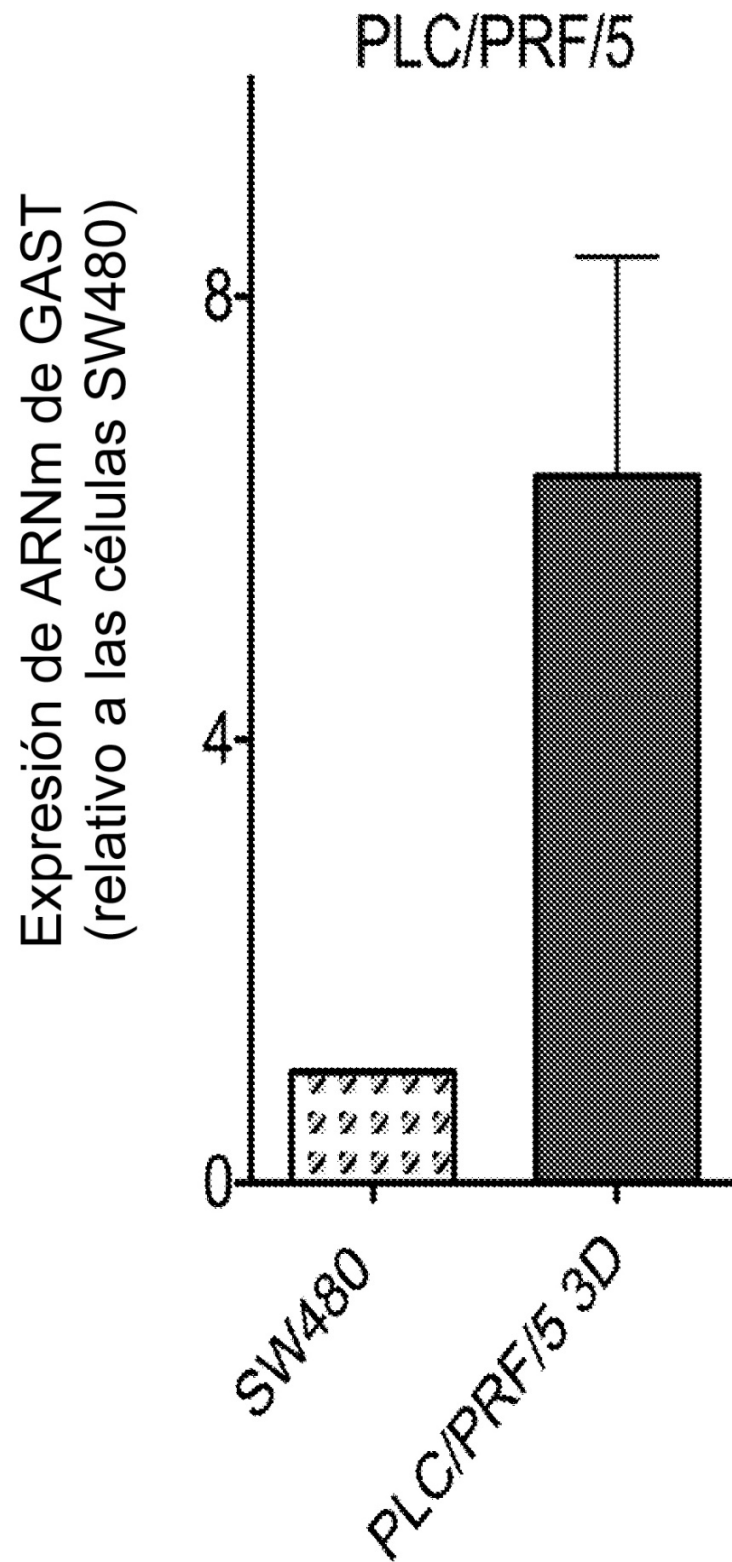


FIG. 5B

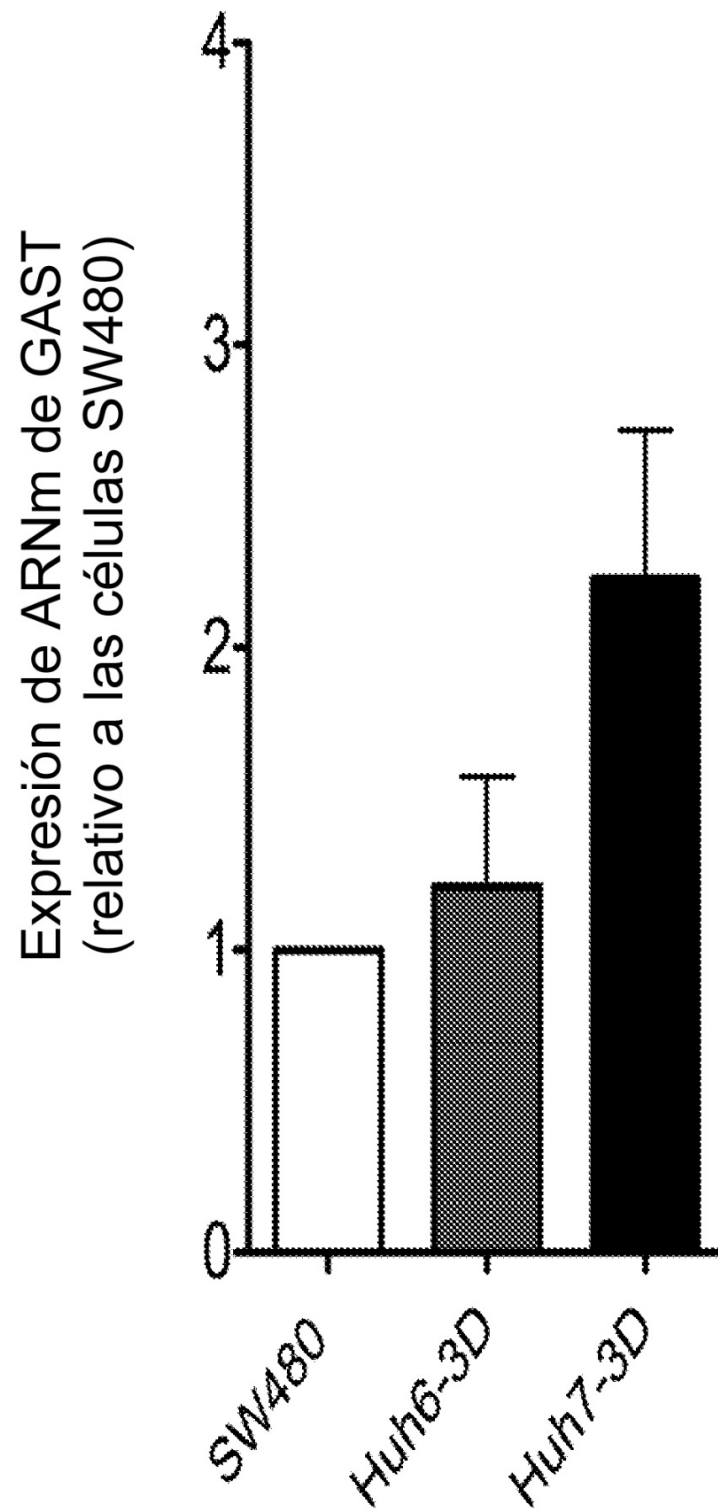


FIG. 6A

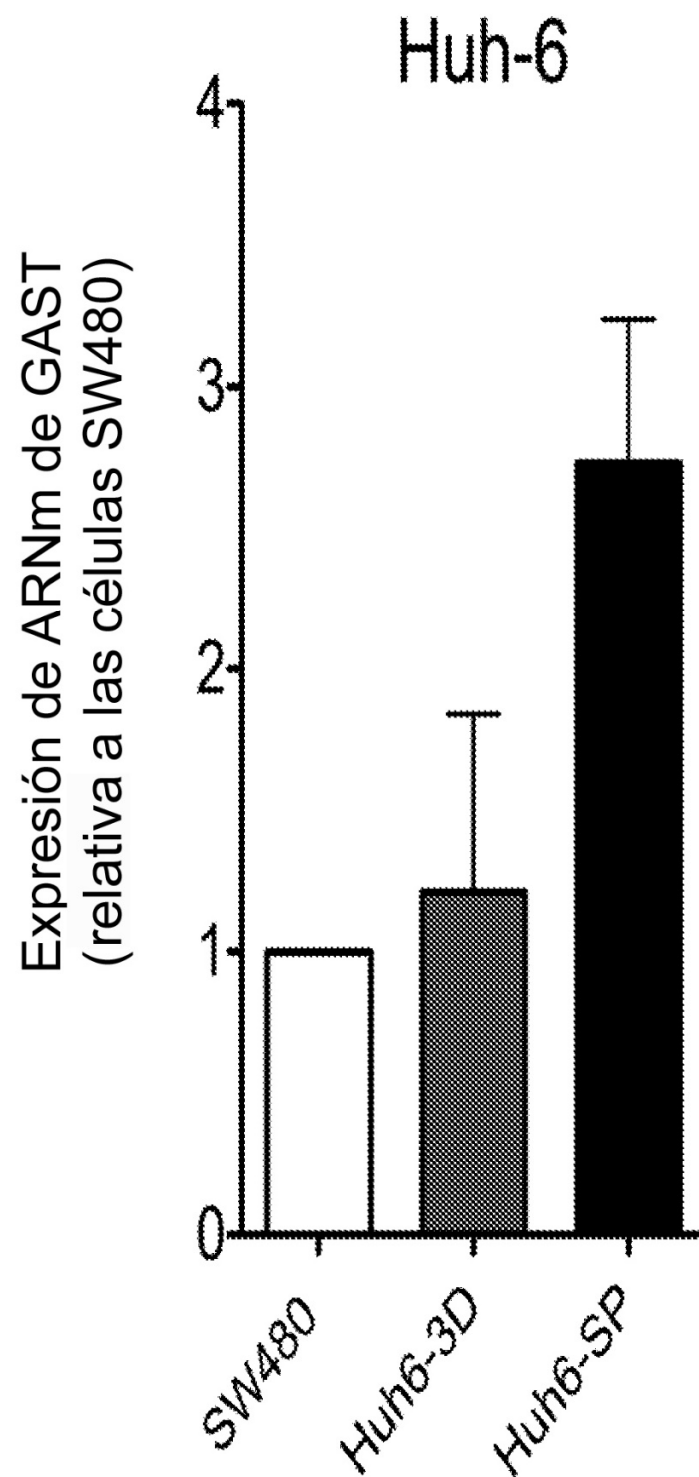


FIG. 6B

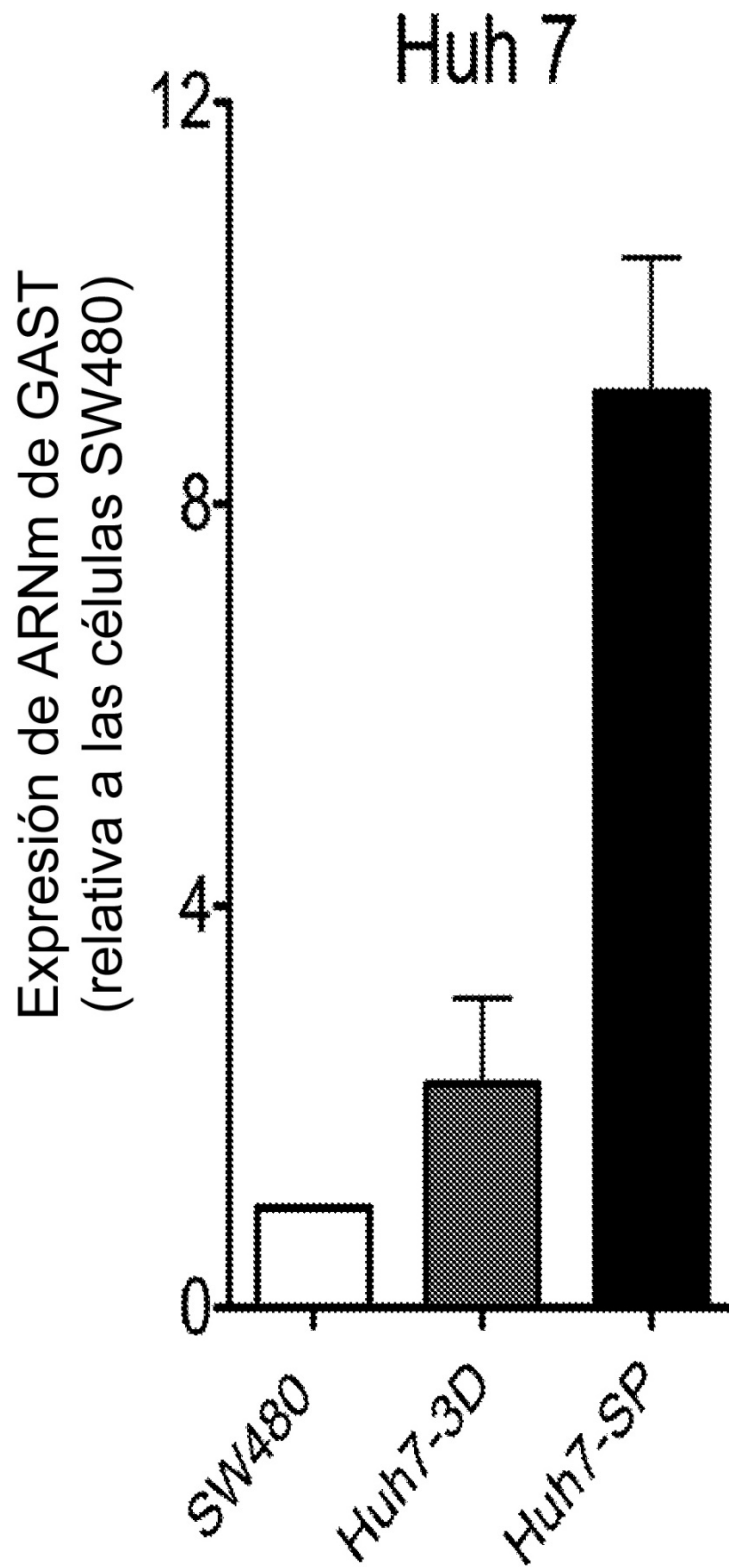


FIG. 7

PLC/PRF/5

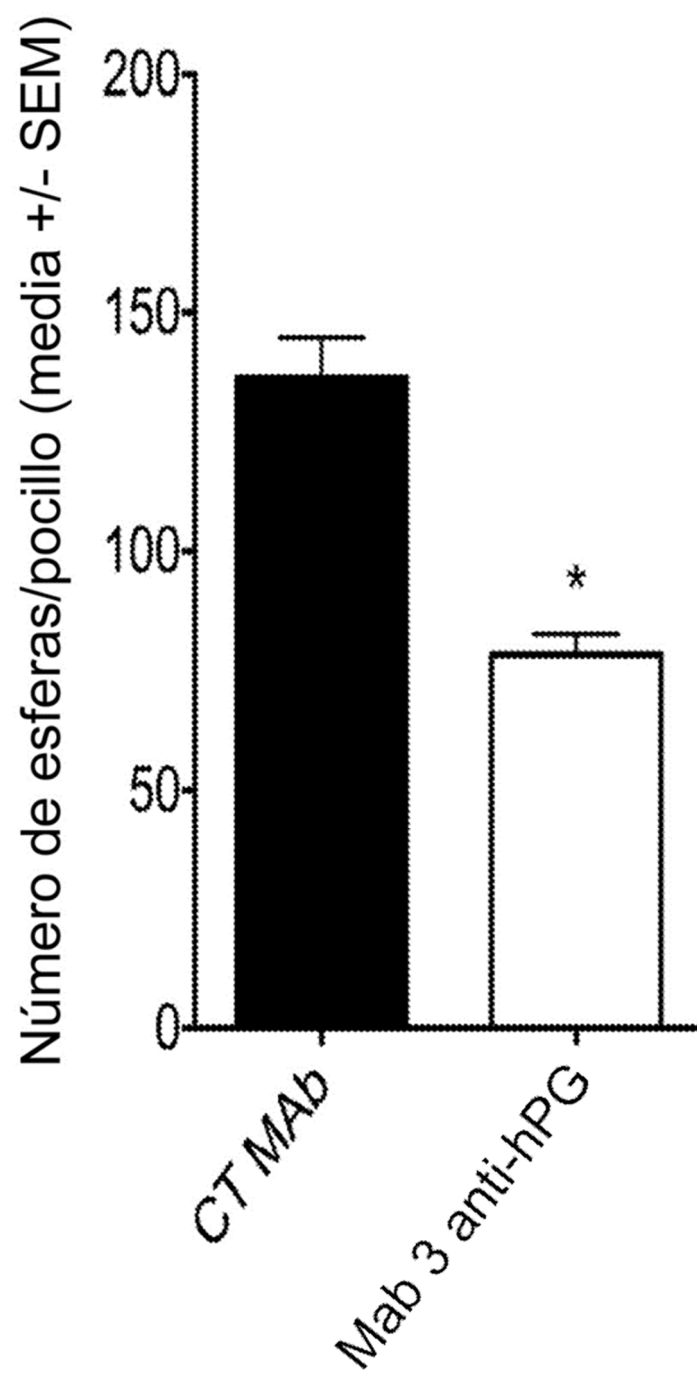
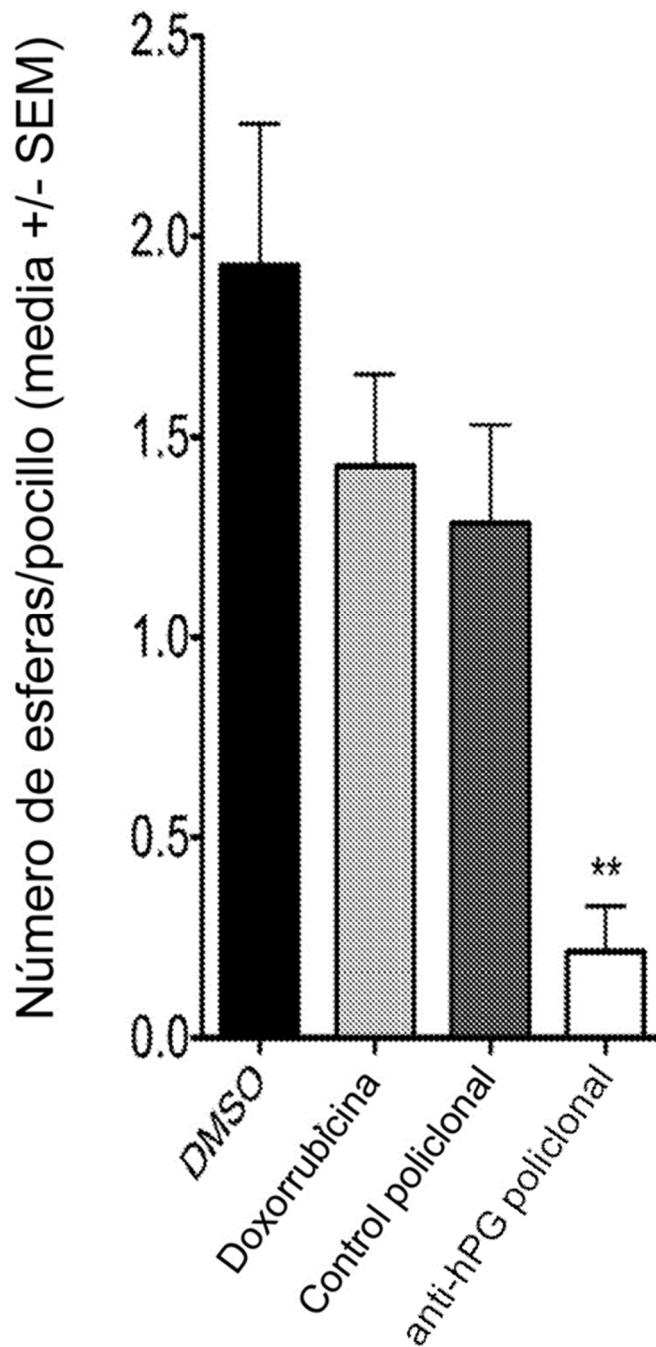


FIG. 8

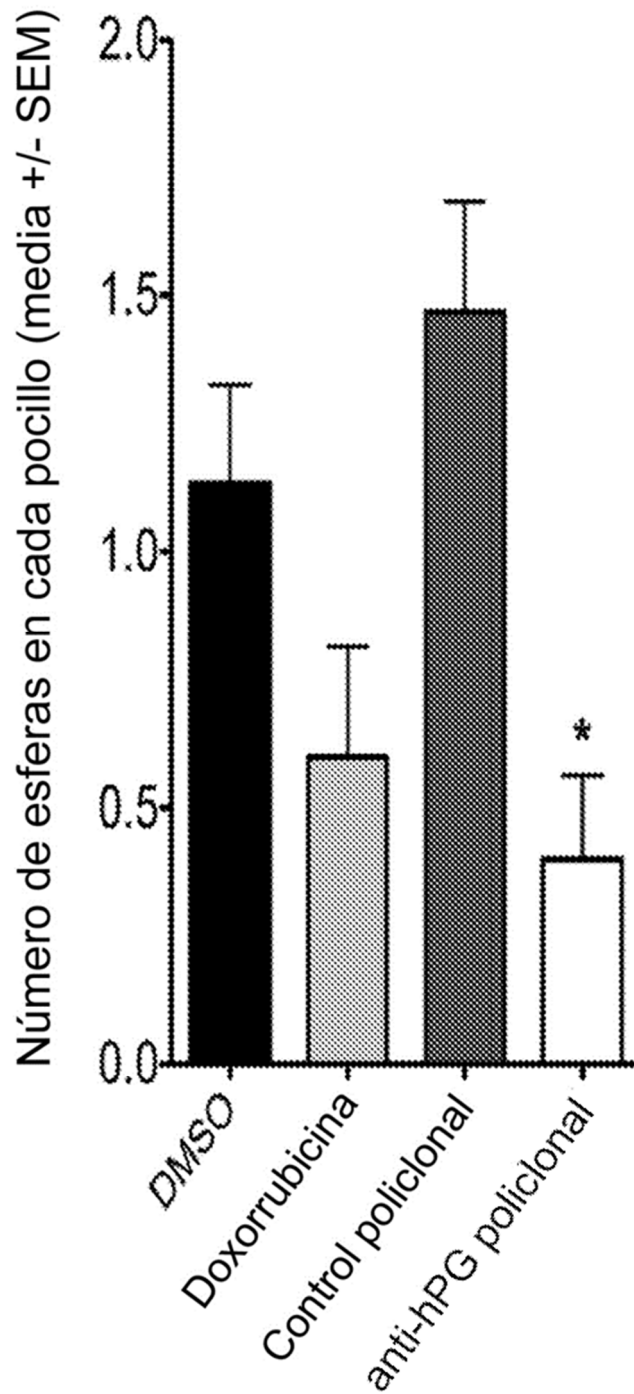
células Huh-6, población secundaria



**p=0.0011 vs. anticuerpo de CT policlonal, prueba Chi cuadrado

FIG. 9

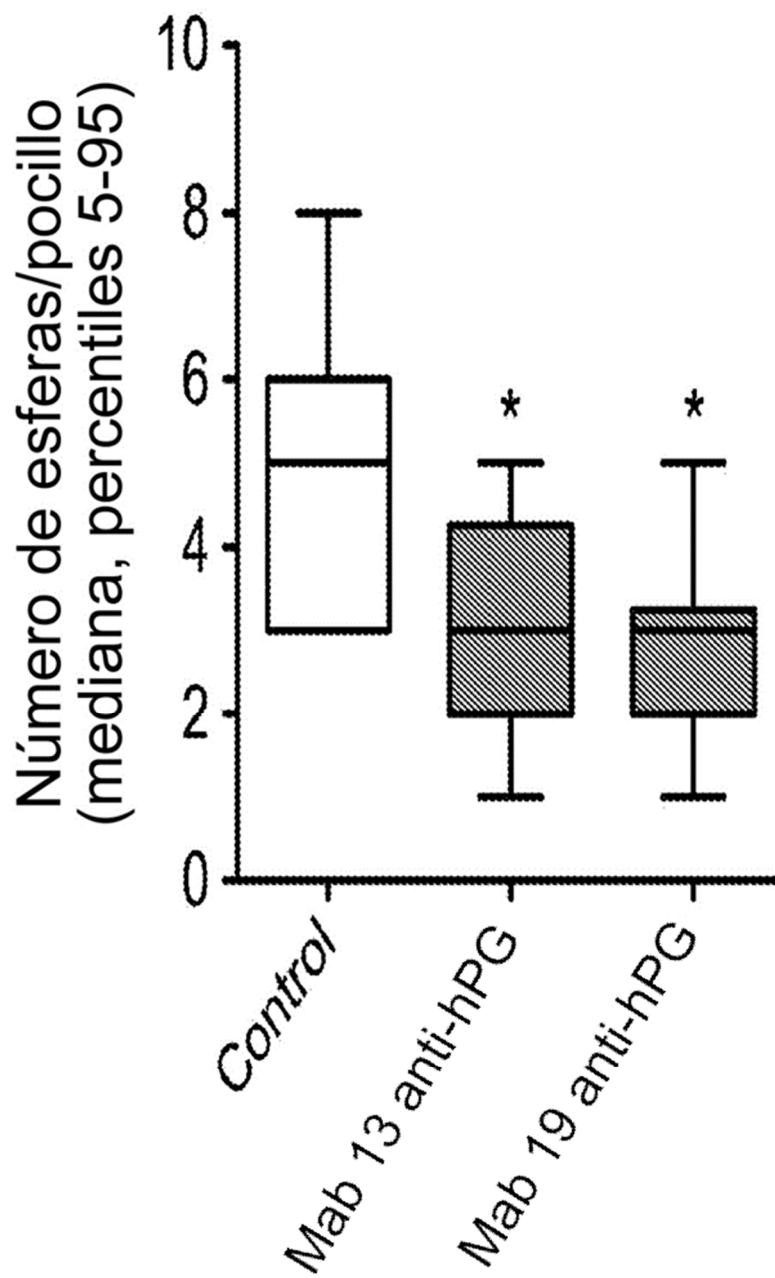
Células Huh-7, población secundaria



*p=0.0120 vs anticuerpo de control policlona
prueba Chi cuadrado

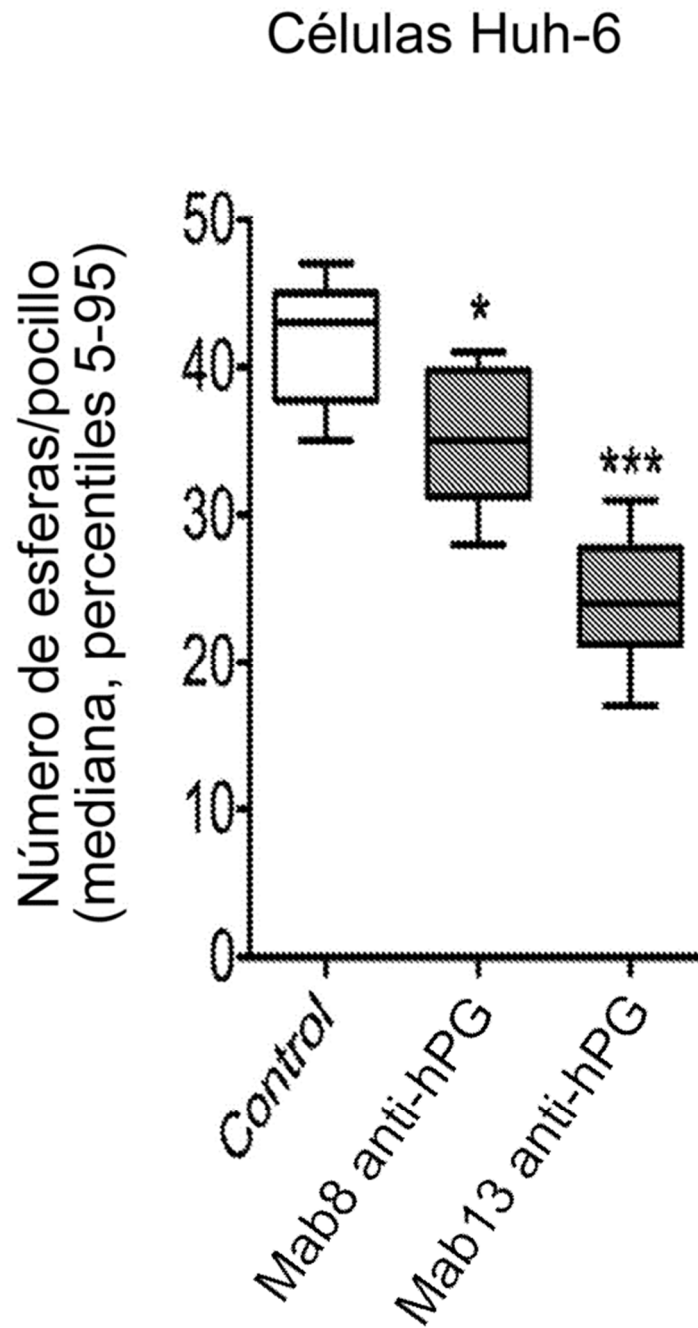
FIG. 10

Células Huh-6



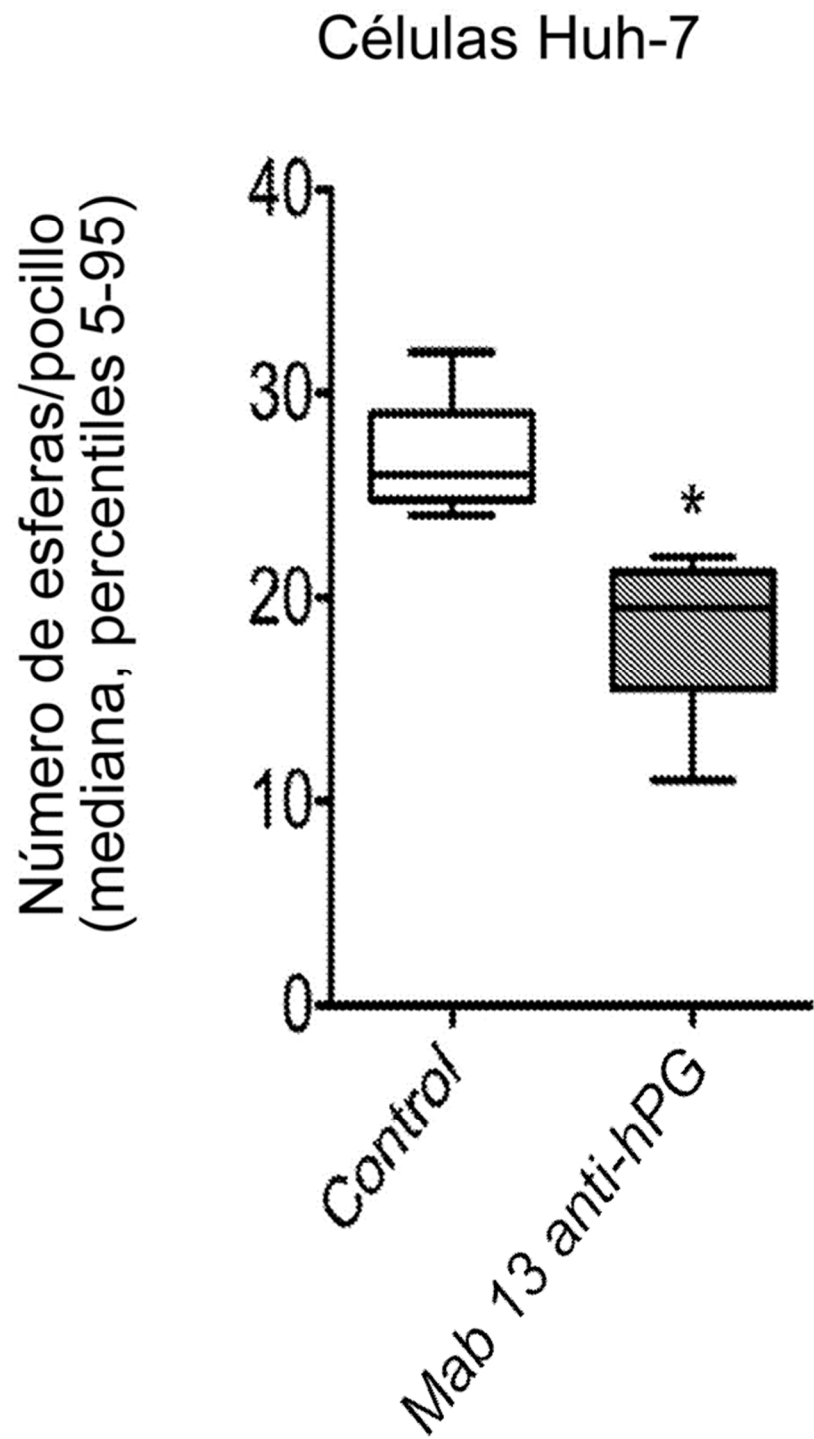
* $p < 0.05$, ANOVA unidir. con pruebas post-hoc de Bonferroni

FIG. 11



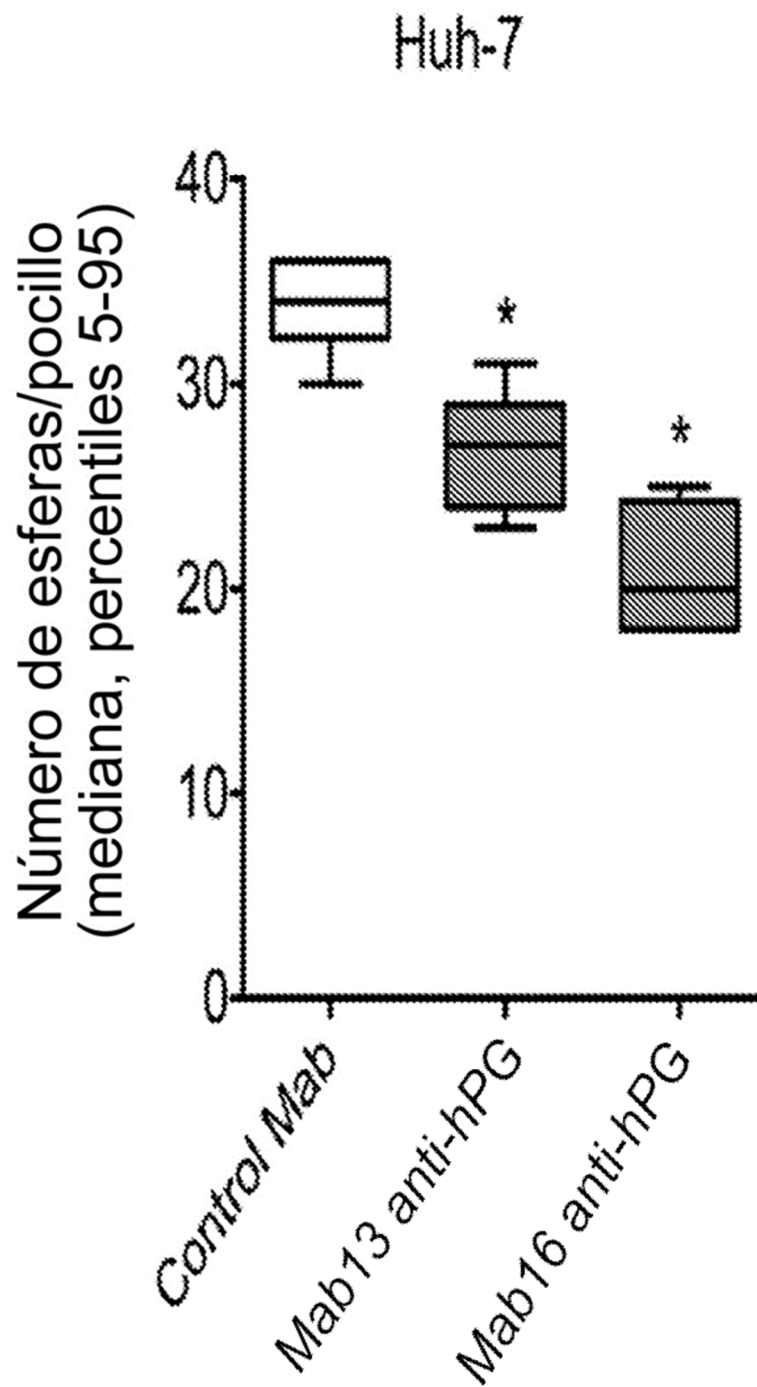
* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$,
ANOVA unidir. con pruebas post-hoc de
Bonferroni

FIG. 12A



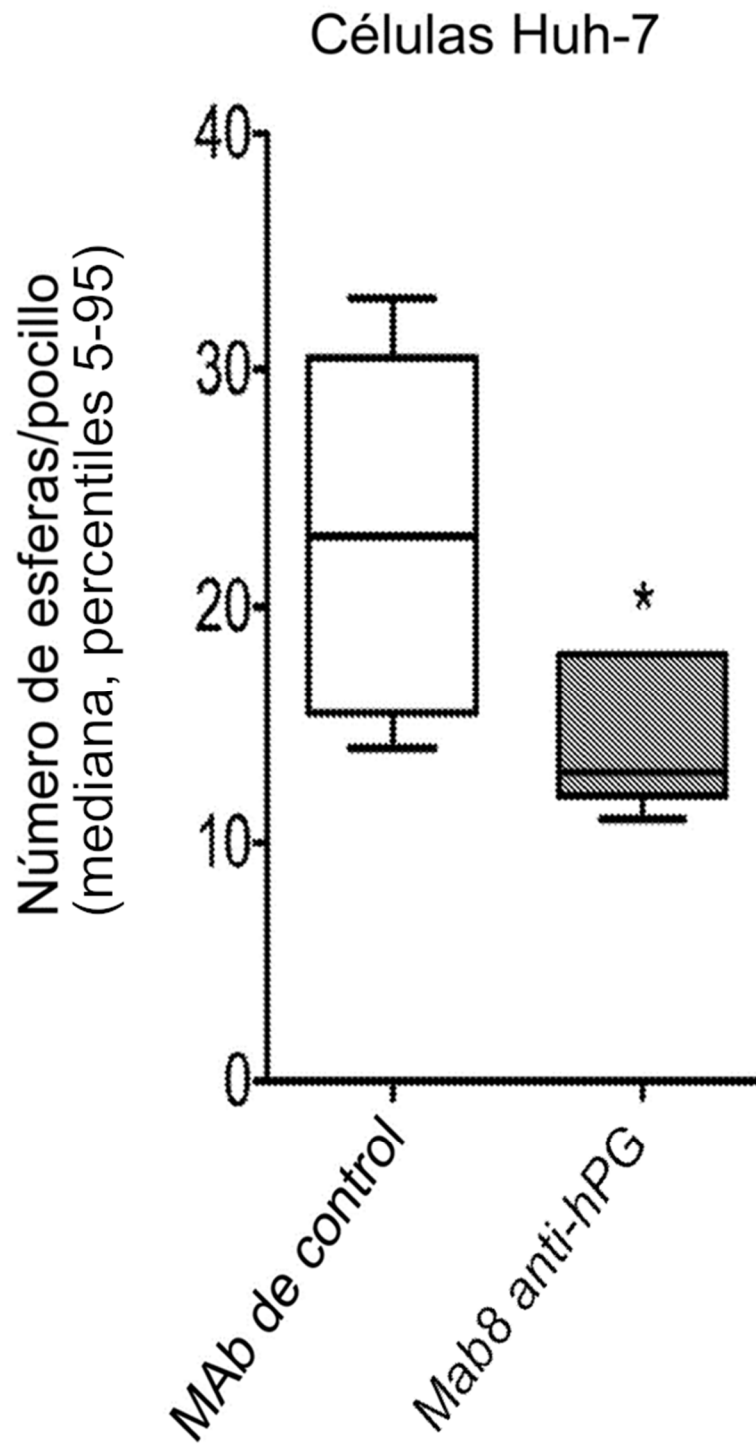
**p<0.017, prueba t de dos colas*

FIG. 12B



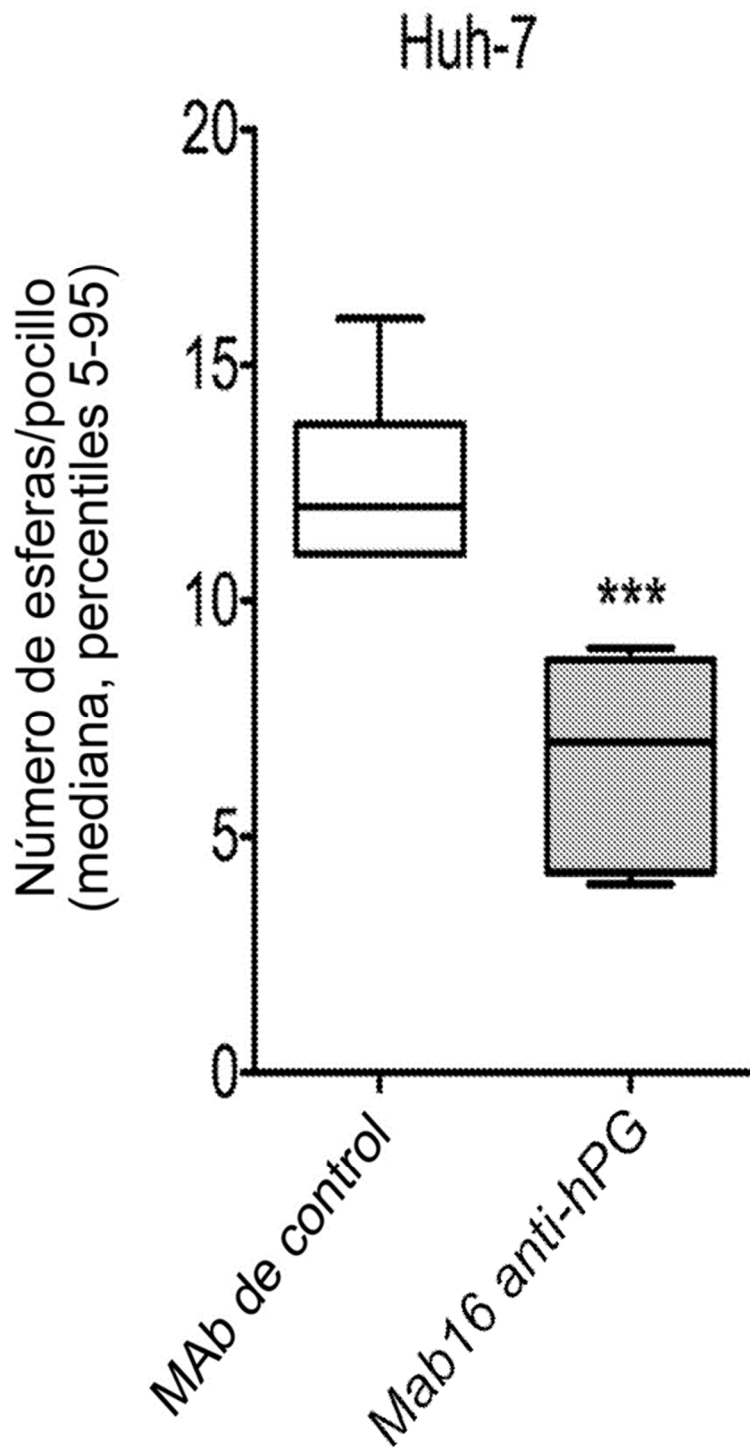
* $p < 0.05$, ANOVA unidir. con pruebas post-hoc de Bonferroni

FIG. 13A



* $p=0.02$, prueba t de dos colas

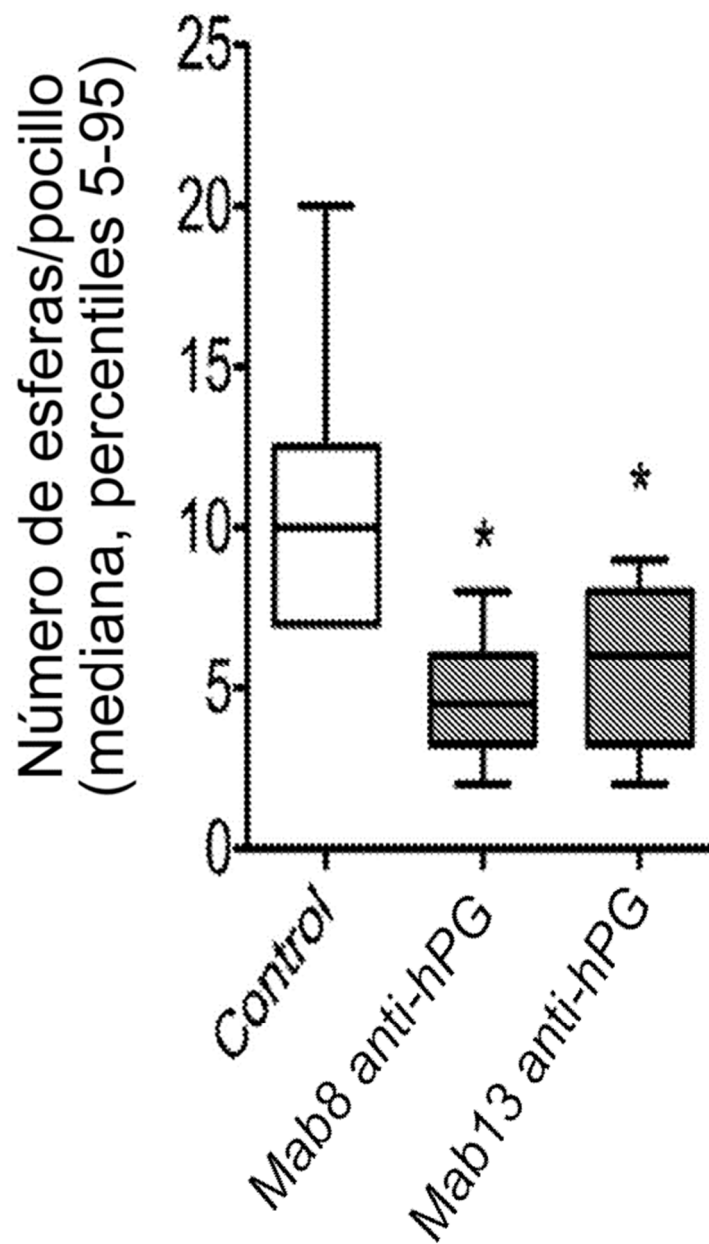
FIG. 13B



*** $p < 0.0001$, prueba t de dos colas

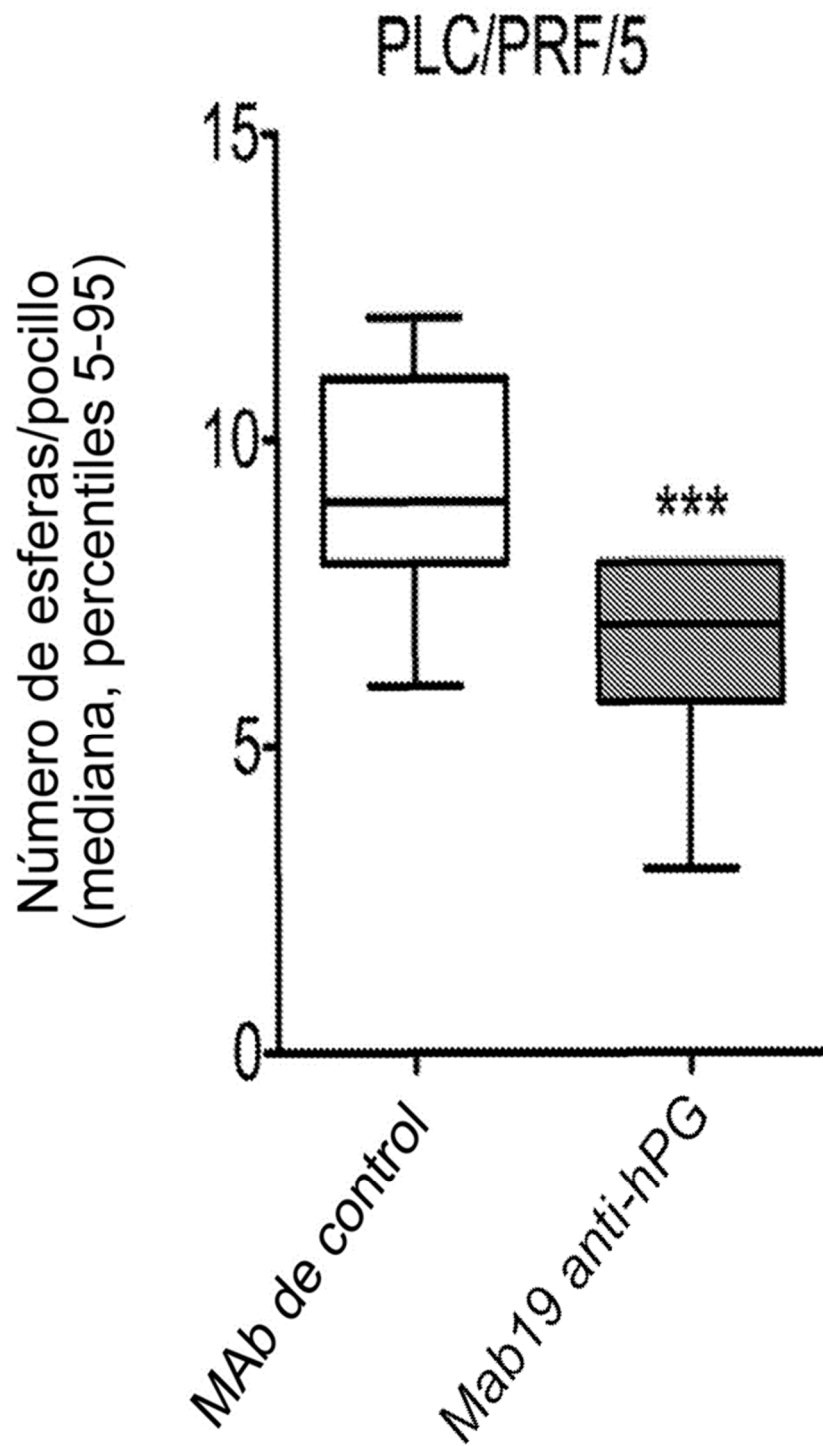
FIG. 14

Huh-7, población secundaria



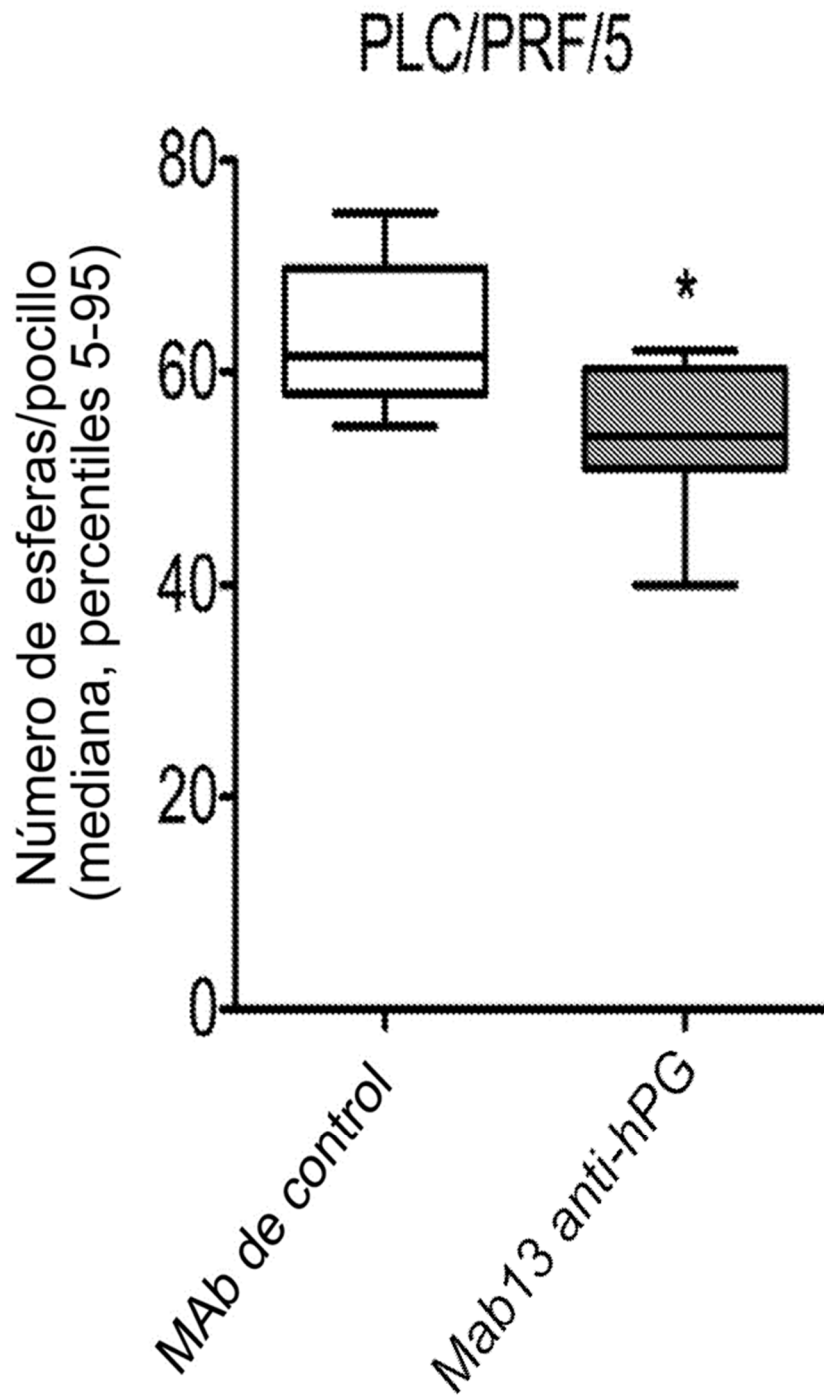
* $p < 0.05$, ANOVA unidir. con pruebas post-hoc de Bonferroni

FIG. 15A



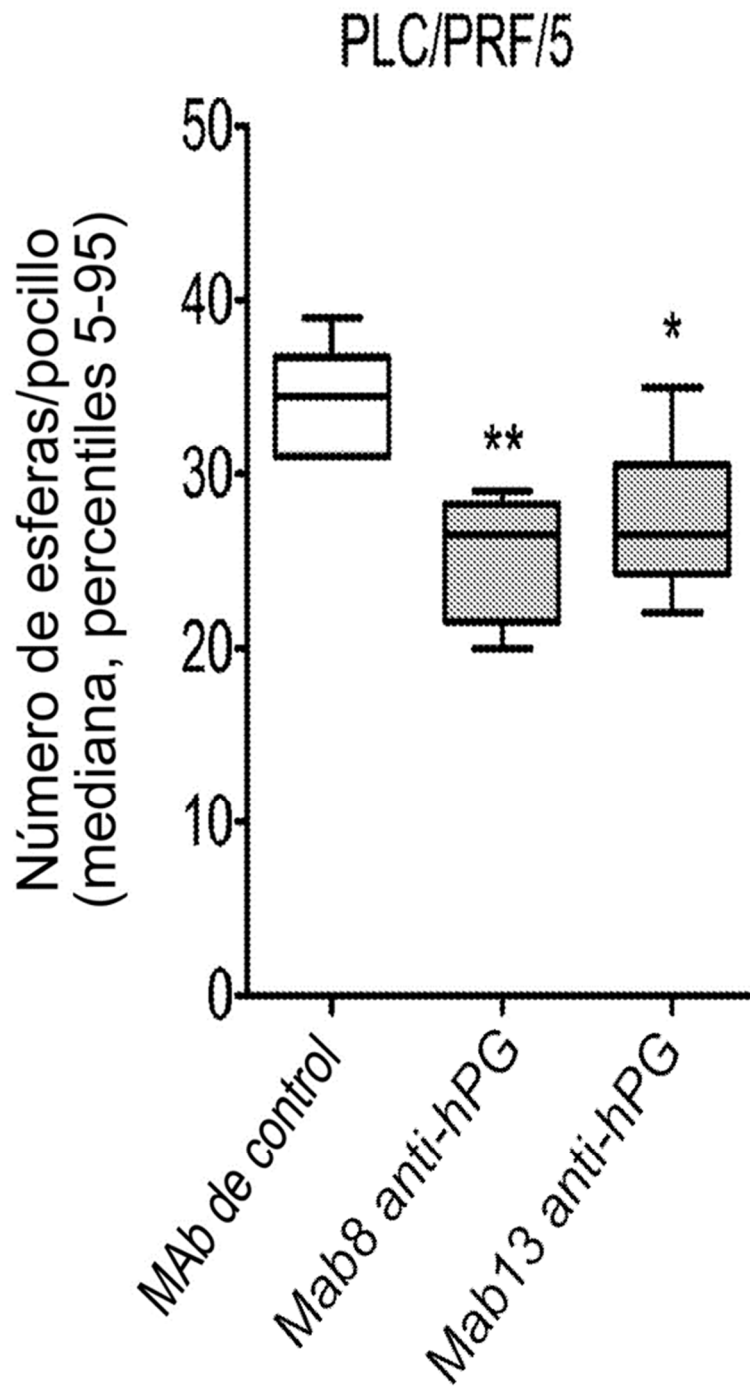
*** $p=0.0077$, prueba t de dos colas

FIG. 15B



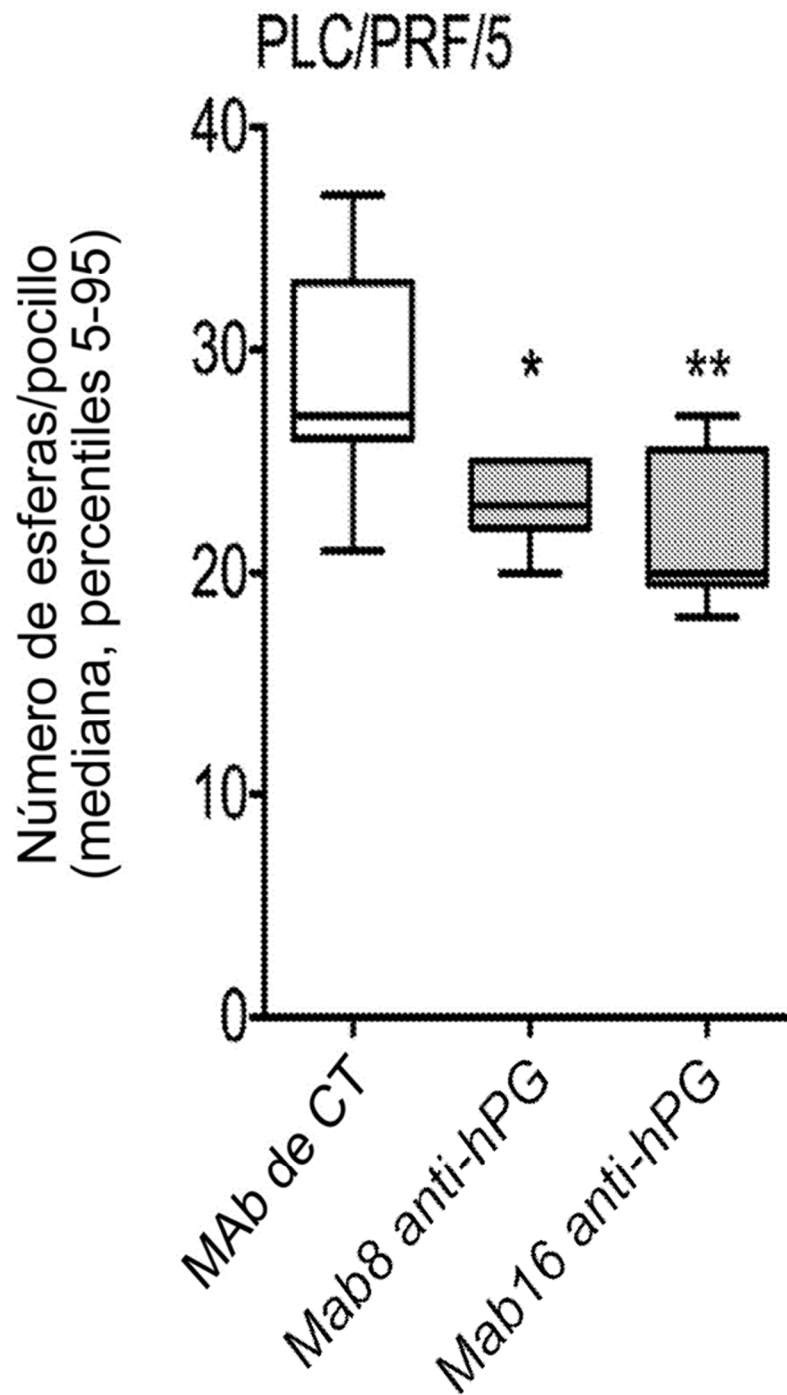
* $p=0.0267$, prueba t de dos colas

FIG. 15C



* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, ANOVA unidirec. con pruebas post-hoc de Bonferroni

FIG. 16

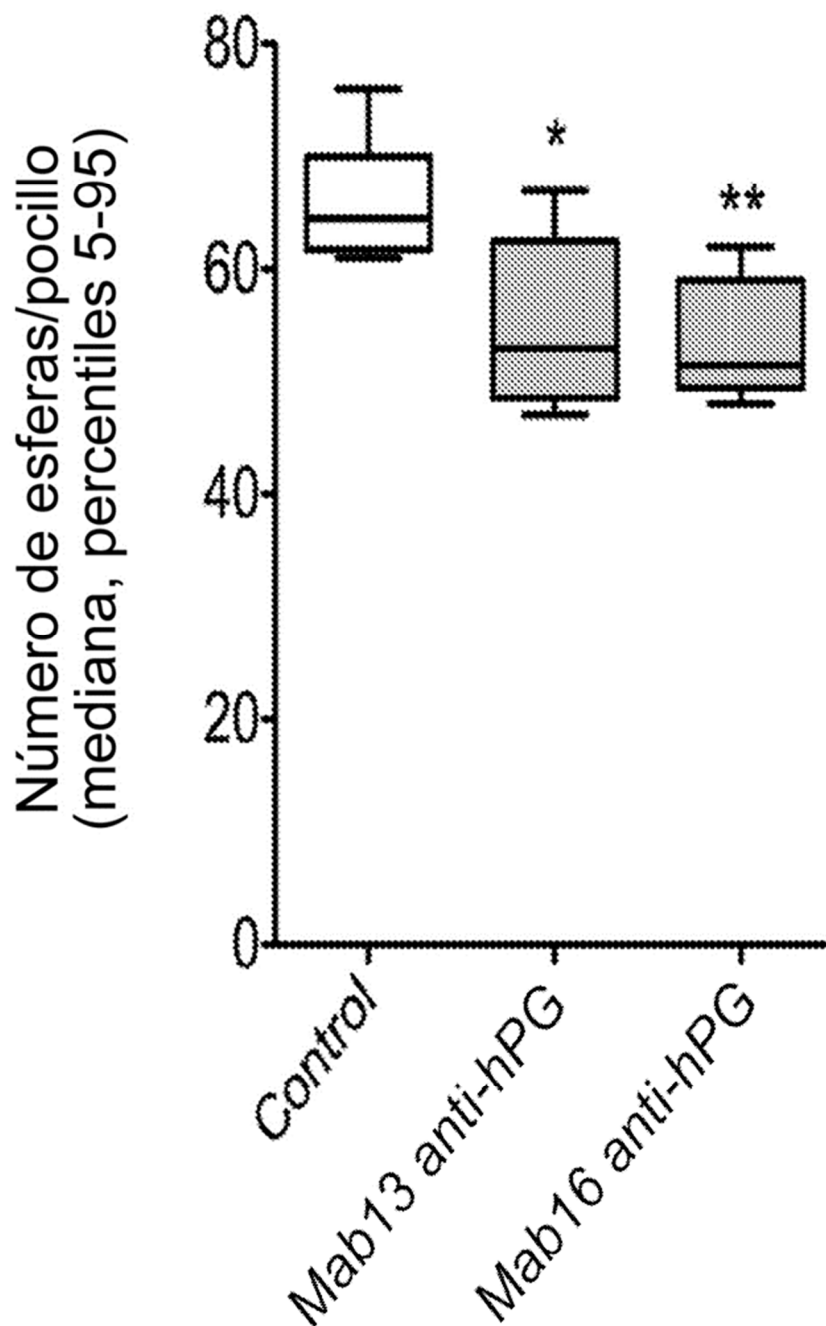


* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$,

ANOVA unidir. con pruebas post-hoc de Bonferroni

FIG. 17

PLC/PRF/5, población secundaria



* $p < 0.05$ y ** $p < 0.05$,
ANOVA unidir. con pruebas post-hoc
de Bonferroni