



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012008818-1 B1



(22) Data do Depósito: 15/10/2010

(45) Data de Concessão: 19/10/2021

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-HPG, COMPOSIÇÃO E USO DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C07K 16/26; A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 16/10/2009 US 61/252,625.

(73) Titular(es): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM); CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE; LES LABORATOIRES SERVIER.

(72) Inventor(es): JULIE PANNEQUIN; LAURE BOUDIER; DOMINIQUE JOUBERT; FRÉDÉRIC HOLLANDE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010006329 de 15/10/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/045080 de 21/04/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/04/2012

(57) Resumo: ANTICORPOS MONOCLONALIS, COMPOSIÇÃO OS COMPREENDENDO, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA HOSPEDEIRA, HIBRIDOMA, KIT E MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DO REFERIDO ANTICORPO, PARA INIBIÇÃO DE PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE TUMOR COLORRETAL, PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER COLORRETAL, PARA SELECIONAR PACIENTE PARA TERAPIA E PARA MONITORAR EFICÁCIA DO TRATAMENTO DO REFERIDO CÂNCER. A presente descrição é dirigida a anticorpos monoclonais para progastrina, seus fragmentos, composições que compreendam anticorpos monoclonais para progastrina e métodos para fazer e usar anticorpos monoclonais para progastrina e suas composições. A presente descrição é dirigida a métodos de tratamento de câncer colorretal com anticorpos monoclonais para progastrina e composições que compreendam anticorpos monoclonais para progastrina ou seus fragmentos. A presente descrição é dirigida a métodos que compreendem a detecção de progastrina, incluindo métodos para diagnosticar o câncer colorretal e métodos de monitoração da eficácia da terapia anticâncer em indivíduos que sofrem de câncer colorretal.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-hPG, COMPOSIÇÃO E USO
DOS MESMOS".**

1. REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Esse pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. § 119(e) do pedido provisório no. 61/252.625, depositado em 16 de outubro de 2009, cujos conteúdos estão incorporados aqui por referência em sua totalidade.

2. DECLARAÇÃO DE PESQUISA PATROCINADA PELO GOVERNO

[002] Nenhuma.

3. PARTES DE UMA PESQUISA EM COMUM ACORDO

[003] Nenhuma.

**4. REFERÊNCIA A LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS, TABELA OU
PROGRAMA DE COMPUTADOR**

[004] Uma Listagem de Sequências está incluída em anexo.

5. CAMPO DA INVENÇÃO

[005] A presente descrição está direcionada, entre outras coisas, para anticorpos monoclonais para progastrina, composições e métodos para fazer tais anticorpos e métodos de uso de tais anticorpos, por exemplo, no diagnóstico e/ou tratamento do câncer colorretal.

6. ANTECEDENTES

[006] O Câncer Colo-retal (CRC) é um problema importante de saúde pública, que afeta mais do que 1.000.000 de pessoas a cada ano e responde por mais do que 500.000 mortes a cada ano. CRC é a segunda causa principal de morte devida a câncer. Apenas nos Estados Unidos, em 2009, aproximadamente 147.000 novos casos e mais do que 49.000 mortes devidas a CRC foram relatados. Existem três formas de CRC: CRC esporádico; câncer de cólon não polipose hereditário (HNPCC), causado por mutações da linhagem germinativa em genes que reparam o não pareamento de DNA; e polipose adenomatosa familiar (FAP), devida a

mutações da linhagem germinativa no gene APC. CRC esporádico é responsável por quase 85% dos casos, enquanto que HNPCC é responsável por cerca de 5% e FAP é responsável por cerca de 1% (Heyer *et al.*, 1999, *Oncogene* 18:5325-5333).

[007] O manuseio clínico de CRC envolve, tipicamente, a ressecção cirúrgica de tumores geralmente acompanhada de quimioterapia. Atualmente, cerca de 50% dos pacientes com CRC morrem cinco anos depois do diagnóstico. A falta de testes de rastreamento confiáveis e a ineficácia das terapias disponíveis atualmente são as principais causas da alta taxa de mortalidade. Existe uma necessidade urgente de novas abordagens clínicas para o diagnóstico de CRC, assim como de tratamentos eficazes contra tumores de câncer colorretal que possuam efeitos adversos mínimos sobre o tecido de outra maneira saudável.

7. SUMÁRIO

[008] O presente pedido fornece composições e métodos úteis para diagnosticar e/ou tratar o câncer colorretal (CRC) em animais, incluindo humanos. As várias invenções descritas no pedido são baseadas, em parte, na descoberta dos requerentes de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a progastrina (PG), por exemplo, progastrina humana (hPG), um polipeptídeo produzido pelas células do tumor de CRC e que exibem atividades antiproliferativas em modelos de CRC *in vitro*.

[009] A progastrina é produzida pelas células do tumor colorretal e é considerada estimulante para proliferação dessas células pelo desencadeamento de uma via de transdução de sinal que bloqueia os processos normais de diferenciação celular, incluindo aqueles processos que levam à morte celular. A depleção do transcrito de gene de gastrina que codifica a progastrina induz a diferenciação celular e a morte celular programada em células tumorais em modelos de CRC *in*

vitro e *in vivo*, reduzindo a proliferação da célula tumoral. Apesar de não pretender estar ligado a qualquer teoria de operação, através da ligação de PG, os anticorpos anti-PG são considerados bloquear ou inibir sua habilidade de interagir com seus parceiros de sinalização. Isso, por sua vez, inibe uma via de transdução de sinal em células de tumor colorretal que poderia, de outra maneira, levar a proliferação.

[010] Consequentemente, em um aspecto, a presente descrição fornece anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a PG, por exemplo hPG, mas não a outros produtos do gene de gastrina. Com referência a FIG. 1, o gene de gastrina é traduzido em um polipeptídeo com 101 aminoácidos chamado de pré-progastrina, que contém uma sequência de sinal (sublinhada) que é clivada, dando origem a progastrina, um polipeptídeo com 80 aminoácidos. A progastrina, por sua vez, é clivada para gerar um produto com 34 aminoácidos, que corresponde aos resíduos 38 a 71 de progastrina, que é então prolongado em sua terminação carbóxi com um resíduo de glicina, gerando G34 prolongado com glicina ("G34-Gly"). Um subproduto dessa clivagem é um peptídeo com 5 aminoácidos, chamado de peptídeo flankeador C-terminal ou CTFP, que inclui os resíduos 75 a 80 de progastrina. G34-Gly é então clivado para gerar um polipeptídeo com 17 resíduos que corresponde em sequência aos resíduos 55 a 71 de progastrina e referido como G17-Gly. A remoção das glicinas C-terminais de G34-Gly e G17-Gly, seguida pela amidação C-terminal, fornece G34 e G17, respectivamente, ambos os quais são amidados no C-terminal. Portanto, enquanto os primeiros 37 resíduos de progastrina são únicos para ela (isto é, não estão presentes em seus produtos de processamento, tais como G34, G34-Gly, G17, G17-Gly ou CTFP), os resíduos 38 a 80 também estão presentes nos produtos pós-traducionais do gene de gastrina.

[011] Os requerentes descobriram que, embora os anticorpos

monoclonais anti-PG possam ser originados usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, a seleção do antígeno é importante. Nem todos os antígenos derivados de hPG estimulam a produção de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a hPG sob condições fisiológicas. Como descrito abaixo, vários antígenos usados para originar anticorpos policlonais para hPG, tal como a progastrina humana recombinante de extensão completa (veja, por exemplo, Singh WO 08/076454) e peptídeos que correspondem aos últimos dez aminoácidos da extremidade C-terminal de hPG (veja, por exemplo, Hollande WO 07/135542), falharam em gerar anticorpos monoclonais anti-hPG. Os requerentes, entretanto, descobriram sequências antigênicas N- e C-terminais dentro da sequência de hPG que podem ser usadas para gerar anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a hPG. Quase surpreendentemente, os requerentes descobriram que não é necessário limitar as sequências do antígeno a fitas da sequência de PG que são únicas para ela para obter anticorpos monoclonais que se liguem especificamente a PG e não a outros produtos derivados do gene de gastrina. Antígenos peptídicos que possuem sequências em comum com outros produtos do gene de gastrina, por exemplo, G17, G34 e CTFP, forneceram anticorpos monoclonais que não se ligaram apenas a hPG, mas se ligaram a ela especificamente.

[012] Os requerentes geraram anticorpos monoclonais usando antígenos derivados de diferentes regiões da molécula de hPG. Os anticorpos monoclonais anti-hPG obteníveis usando um antígeno peptídico que possui uma sequência que corresponde a uma região N-terminal de hPG e/ou que se liguem a uma região N-terminal de hPG, são referidos aqui como "anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminal". Uma região antigênica exemplificadora específica que pode ser usada para construir um imunógeno útil para a obtenção de anticorpos

monoclonais anti-hPG N-terminal corresponde aos resíduos 1 a 14 de hPG: SWKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 25). Imunógenos exemplificadores incluindo esse antígeno útil para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminal estão descritos na Tabela 1A e na seção de Exemplos.

[013] Anticorpos monoclonais anti-PG obteníveis usando um antígeno peptídico que possui uma sequência que corresponde a uma região C-terminal de hPG e/ou que se ligue a uma região C-terminal de hPG, são referidos aqui como "anticorpos monoclonais anti-hPG C-terminais". Uma região antigênica exemplificadora específica que pode ser usada para construir um imunógeno útil para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-PG C-terminais corresponde aos resíduos 55 a 80 de hPG: QGPWLEEEEAYGWMDFG RRSAEDEN (SEQ ID NO: 27). Imunógenos exemplificadores que incluem esse antígeno útil para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-hPG C-terminal estão descritos na Tabela 1B e na seção de Exemplos.

[014] Para alguns usos, é desejável ter anticorpos monoclonais anti-hPG com alta afinidade por hPG. Para certos usos, tal como usos terapêuticos, uma afinidade de pelo menos cerca de 100 nM é desejável, embora anticorpos que possuem afinidades maiores, por exemplo, afinidades de pelo menos cerca de 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM ou até maiores, possam ser desejáveis. Os vários anticorpos monoclonais anti-PG exemplificadores específicos aqui descritos exibem afinidades que variam entre 10^{-6} a 10^{-12} (veja Tabela 6). Um anticorpo monoclonal anti-PG que possua uma afinidade especialmente adequada para uma aplicação desejada em particular pode ser rapidamente selecionado entre esses ou gerado ou projetado usando vários imunógenos, sequências de regiões determinantes de complementaridade (CDR),

sequências de cadeia variável pesada V_H e variável leve V_L e métodos aqui descritos. A afinidade de qualquer anticorpo monoclonal anti-PG particular pode ser determinada usando técnicas bem conhecidas ou descritas aqui, tais como, por exemplo, ELISA, calorimetria de titulação isotérmica (ITC), BIACore ou ensaio de polarização fluorescente.

[015] hPG é um polipeptídeo relativamente pequeno, tendo apenas 80 aminoácidos de extensão. Deveria ser esperado que qualquer anticorpo monoclonal que se ligue especificamente a hPG com uma afinidade relativamente alta (por exemplo, pelo menos cerca de 10 nM) pudesse interferir com a habilidade de PG de interagir com seus parceiros de sinalização e, como resultado, inibir a proliferação de células de CRC. Entretanto, os requerentes descobriram que nem todos os anticorpos monoclonais anti-PG são neutralizantes (isto é, nem todos os anticorpos monoclonais que se ligam a PG interferem ou inibem sua atividade de sinalização biológica). De fato, como será discutido em mais detalhes na seção de Exemplos, os requerentes descobriram que alguns anticorpos monoclonais anti-PG, apesar de exibir alta especificidade e alta afinidade por PG, não neutralizam PG. Por exemplo, o MAb14 anti-hPG se liga a hPG com uma K_D de cerca de 6 pM, mas não inibe o crescimento de células CRC *in vitro* como detalhado na seção de Exemplos abaixo. Embora os anticorpos monoclonais não neutralizantes que se ligam especificamente a hPG sejam úteis para propósitos de diagnóstico, aqueles anticorpos monoclonais anti-hPG que neutralizam PG são particularmente adequados para as aplicações terapêuticas para tratar CRC.

[016] Como usado aqui, um "anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante" é um anticorpo monoclonal anti-hPG que fornece uma redução estatisticamente significativa no número de células de CRC vivas em uma amostra de teste tratada com o anticorpo monoclonal anti-hPG quando comparado com uma amostra de controle tratada com um

anticorpo monoclonal não específico. Um ensaio específico para avaliar a habilidade de qualquer anticorpo monoclonal anti-hPG em particular para neutralizar hPG está descrito na seção de Descrição Detalhada abaixo. Aqueles anticorpos monoclonais anti-hPG que exibem pelo menos cerca de 50% de redução no número de células vivas nesse ensaio são considerados ser especialmente úteis no tratamento de CRC, embora anticorpos monoclonais anti-hPG que exibem níveis menores de atividade neutralizante, por exemplo, uma redução estatisticamente significativa de 40%, 30%, 20%, 15% ou até 10% no número de células vivas nesse ensaio são esperados fornecer benefícios terapêuticos.

[017] Consequentemente, em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-PG são anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes. Foi descoberto que a habilidade de um anticorpo monoclonal anti-PG em neutralizar PG não é dependente do epítopo. Como exemplificado na seção de Exemplos, ambos os anticorpos anti-PG N-terminal e C-terminal possuem atividade neutralizante. Portanto, em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes são anticorpos neutralizantes N-terminais, em outras modalidades, os anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes são anticorpos neutralizantes C-terminais.

[018] O mapeamento de epítopo revela que os anticorpos monoclonais anti-PG N-terminais não se ligam todos ao mesmo epítopo, mesmo quando originados contra o mesmo imunógeno. O mesmo é verdadeiro para os anticorpos monoclonais anti-hPG C-terminais. Os epítopos ligados por anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminal e C-terminal, como identificados através de rastreamento de alanina e da técnica SPOT, são fornecidos na seção de Exemplos, nas Tabelas 8 e 9.

[019] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG se ligam a um epítopo que inclui uma sequência de aminoácidos

que corresponde a uma porção N-terminal de hPG. Em modalidades específicas, os anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminais se ligam a um epítopo que inclui os resíduos 10 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 28), resíduos 9 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 29), resíduos 4 a 10 de hPG (SEQ ID NO: 30), resíduos 2 a 10 de hPG (SEQ ID NO: 31), ou os resíduos 2 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 32).

[020] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG se ligam a um epítopo que inclui uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma porção de uma região C-terminal de hPG. Em modalidades específicas, os anticorpos monoclonais anti-hPG C-terminais se ligam a um epítopo que inclui os resíduos 71 a 74 de hPG (SEQ ID NO: 33), resíduos 69 a 73 de hPG (SEQ ID NO: 34), resíduos 76 a 80 de hPG (SEQ ID NO: 35), ou resíduos 67 a 74 de hPG (SEQ ID NO: 36).

[021] É esperado que CDRs e/ou cadeias V_H e V_L correspondentes de anticorpos monoclonais anti-hPG que se ligam aproximadamente aos mesmos epítopos, possam ser alternadas para fornecer novos anticorpos monoclonais anti-hPG. Por exemplo, como observado na Tabela 9, anticorpos monoclonais anti-hPG MAb5 e MAb6 exemplificadores se ligam ao mesmo epítopo. Um anticorpo monoclonal anti-hPG pode ser planejado para incluir em sua cadeia V_L várias combinações de CDRs de V_L desses dois anticorpos e/ou em sua cadeia V_H , várias combinações de CDRs de V_H desses dois anticorpos. Como um exemplo específico, para ilustrar as várias combinações possíveis, tal anticorpo pode incluir em sua cadeia V_L as CDRs 1 e 2 de MAb 5 (CDR1.5 de V_L e CDR2.5 de V_L , respectivamente) e a CDR 3 de MAb6 (CDR3.6 de V_L) e em sua cadeia V_H , CDR 1 de MAb 6 (CDR1.6 de V_H) e CDRs 2 e 3 de MAb 5 (CDR2.5 de V_H e CDR3.5 de V_H , respectivamente).

[022] Vários anticorpos monoclonais anti-hPG que possuem alta especificidade e afinidade por hPG e que exibem boa atividade anti-

tumor em ensaios *in vitro* foram identificados e, em alguns exemplos, as sequências de suas CDRs, as sequências de suas cadeias V_H e V_L e/ou as sequências de cadeias V_H e V_L propostas para versões humanizadas, determinadas. Vários hibridomas também foram depositados. Todos esses anticorpos monoclonais anti-hPG exemplificadores, assim como outras modalidades específicas de anticorpos monoclonais anti-hPG úteis nos vários kits e métodos aqui descritos, por exemplo anticorpos monoclonais que competem pela ligação a PG com um anticorpo de referência, estão descritos em mais detalhes na seção Descrição Detalhada.

[023] Anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição incluem anticorpos que competem com um anticorpo monoclonal anti-hPG de referência pela ligação a PG. O anticorpo monoclonal anti-hPG de referência pode ser qualquer um dos anticorpos monoclonais anti-hPG aqui descritos. Exemplos não limitantes incluem: anticorpos que compreendem três CDRs de V_L e três CDRs de V_H como aqui descrito; anticorpos que compreendem uma cadeia V_H e uma cadeia V_L que possuem sequências de aminoácidos como aqui descritas; anticorpos que compreendem polipeptídeos de cadeia pesada e cadeia leve humanizadas como aqui descritas; anticorpos produzidos por qualquer um dos hibridomas aqui descritos; anticorpos que se ligam a um epítopo dentro de hPG como aqui descrito.

[024] Os anticorpos monoclonais anti-PG aqui descritos podem estar na forma de anticorpos de extensão completa, anticorpos de cadeias múltiplas ou de cadeia simples, fragmentos de tais anticorpos que se ligam seletivamente a PG (incluindo, mas não limitado a Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, e scFv), "surrobodies" (incluindo um construto substituto de cadeia leve), anticorpos de domínio simples, anticorpos humanizados, anticorpos camelizados e semelhantes. Eles também podem ser de ou derivados de qualquer isotipo incluindo, por exemplo,

IgA (*por exemplo*, IgA1 ou IgA2), IgD, IgE, IgG (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4), ou IgM. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-PG é uma IgG (*por exemplo*, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4).

[025] Anticorpos monoclonais anti-PG podem ser de origem humana ou não humana. Exemplos de anticorpos anti-PG de origem não humana incluem, mas não são limitados a aqueles de origem de mamífero (*por exemplo*, símios, roedores, cabras e coelhos). Anticorpos monoclonais anti-PG para uso terapêutico em humanos são preferivelmente humanizados.

[026] Em outro aspecto, a presente descrição fornece ácidos nucleicos capazes de serem usados para produzir anticorpos monoclonais anti-PG. Os ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos da cadeia leve e da cadeia pesada de imunoglobulina dos anticorpos monoclonais anti-hPG aqui descritos e vetores que compreendem os ácidos nucleicos são fornecidos. Adicionalmente, células hospedeiras procarióticas e eucarióticas transformadas com tais vetores são aqui fornecidas, assim como células hospedeiras eucarióticas, por exemplo, de mamífero, manipuladas para expressar os polipeptídeos da cadeia leve e pesada dos anticorpos monoclonais anti-hPG são fornecidas. Também são fornecidas células hospedeiras capazes de expressar ambas as cadeias leve e pesada e de secretar os anticorpos monoclonais aqui descritos no meio no qual as células são cultivadas. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é um hibridoma. Métodos de produção de anticorpos monoclonais anti-hPG pelo cultivo de células hospedeiras também são fornecidos.

[027] Anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes, tais como anticorpos monoclonais anti-hPG, se ligam a PG e bloqueiam a sinalização dependente de PG, resultando na inibição das respostas induzidas por PG nas células de tumor de CRC. Consequentemente, também são fornecidos métodos de inibição das respostas induzidas

por PG de células de CRC, que incluem a repressão da diferenciação celular, repressão da morte celular e/ou a estimulação da proliferação celular. Geralmente, o método compreende contatar uma célula de CRC com ou expor uma população de células a um anticorpo monoclonal anti-PG neutralizante em uma quantidade eficaz para inibir uma ou mais respostas induzidas por PG de células de CRC. O método pode ser realizado *in vitro* ou *in vivo*, pela administração de um anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante ao ambiente contendo as células de CRC, que pode ser uma cultura celular ou em um tumor.

[028] Os anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes aqui descritos inibem a proliferação dependente de PG de células de tumor de CRC, tornando-os agentes terapêuticos úteis para o tratamento de câncer colorretal. Consequentemente, também são fornecidas composições farmacêuticas que compreendem um anticorpo monoclonal anti-PG neutralizante e métodos de usar os anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes e/ou as composições farmacêuticas para tratar CRC. As composições farmacêuticas podem ser formuladas por qualquer via de administração conveniente, incluindo, por exemplo, injeção parenteral, subcutânea ou intravenosa e incluirão, tipicamente, um anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante e um ou mais veículos, excipientes e/ou diluentes aceitáveis adequados para o modo de administração desejado e podem incluir outros componentes opcionais como será descrito posteriormente na seção da Descrição Detalhada. Para usos terapêuticos, as composições podem ser embaladas em forma de dosagem unitária para facilitar o uso.

[029] Os métodos de tratamento geralmente compreendem administrar a um indivíduo que necessite do tratamento, por exemplo, um indivíduo diagnosticado com CRC, uma quantidade de um anticorpo monoclonal anti-PG neutralizante e/ou uma composição farmacêutica desse, eficaz para fornecer um benefício terapêutico. O benefício

terapêutico, descrito abaixo em mais detalhes, inclui qualquer melhora de CRC, por exemplo, alentecendo ou paralisando a progressão de CRC, reduzindo a severidade de CRC, inibindo o crescimento de tumores de CRC ou a proliferação de células, reduzindo o tamanho dos tumores de CRC e/ou reduzindo os níveis séricos de PG em pacientes com CRC. O indivíduo pode ser um humano ou um não humano, incluindo um animal domesticado (por exemplo, gato, cachorro, vaca, porco, cavalo) ou um animal não domesticado. Preferivelmente, o anticorpo monoclonal anti-PG é específico para ao PG da espécie a ser tratada. Por exemplo, um anticorpo anti-hPG é administrado a um paciente humano, um anticorpo anti-PG de cachorro é administrado a um paciente canino e semelhantes. Indivíduos nos quais a terapia com anticorpo monoclonal anti-hPG é útil, podem ser: pacientes em qualquer estágio de progressão da doença (por exemplo, CRC Estágio 0, I, II, III ou IV), pacientes que já receberam terapia para CRC (por exemplo, quimioterapia, terapia de radiação, ressecção cirúrgica) ou pacientes que estão recebendo outra terapia para CRC.

[030] O tratamento com anticorpos monoclonais anti-PG como aqui descrito pode ser combinado ou secundário a outra terapia. Exemplos não limitantes de outras terapias para CRC incluem o tratamento quimioterapêutico, terapia de radiação, ressecção cirúrgica e terapia com anticorpo, como aqui descrita. Em um exemplo específico, os anticorpos monoclonais anti-hPG são administrados em combinação com agentes quimioterapêuticos. Em outro exemplo específico, os anticorpos monoclonais anti-hPG são administrados em conjunto com a ressecção cirúrgica. Os anticorpos monoclonais anti-PG também podem ser usados em combinação com um outro.

[031] Indivíduos com tumores de CRC frequentemente possuem níveis elevados de PG circulante (por exemplo, no soro ou no plasma). Consequentemente, anticorpos monoclonais anti-hPG podem ser

usados para detectar os níveis de PG com propósitos de diagnosticar CRC. Adicionalmente, em pacientes já diagnosticados com CRC, os anticorpos monoclonais anti-hPG podem ser usados para selecionar indivíduos adequados para receber a terapia anti-PG ou para monitorizar a eficácia do tratamento. Como descrito aqui, um método para diagnosticar o câncer colorretal em um indivíduo compreende determinar se a quantidade de progastrina em uma amostra do indivíduo, por exemplo, uma amostra de sangue ou uma amostra de soro, medida usando um anticorpo monoclonal anti-hPG de acordo com a presente descrição, está acima do nível limiar. Em uma modalidade específica, o nível limiar é 50 pM. Em algumas modalidades, dois anticorpos anti-PG são usados, um que reconheça uma região C-terminal de PG e outro que reconheça uma região N-terminal de PG. Nessa modalidade, um ou ambos anticorpos N-terminal e C-terminal é um anticorpo monoclonal anti-PG como aqui descrito. Preferivelmente, anticorpos monoclonais N-terminal e C-terminal anti-PG são usados. Os anticorpos podem ser, mas não necessariamente, neutralizantes.

[032] Para os propósitos de monitoração da eficácia do tratamento, os anticorpos monoclonais anti-PG podem ser usados para determinar se o nível de progastrina está diminuindo ao longo do tempo em amostras de um indivíduo que tenha sido ou esteja sendo tratado para CRC pela comparação da quantidade de PG em amostras retiradas em períodos diferentes. As modalidades específicas de anticorpos anti-PG descritas no parágrafo precedente também podem ser usadas nesse ensaio.

[033] Também são fornecidos kits adequados para vários métodos de diagnóstico, monitoração e outros aqui descritos. Tais kits compreenderão tipicamente um anticorpo monoclonal anti-PG como aqui descrito e, opcionalmente, anticorpos anti-PG adicionais e/ou reagentes adequados para realizar o ensaio específico. Em algumas

modalidades, um ou mais anticorpos anti-PG incluídos no kit são marcados com um marcador detectável, tal como um fluoróforo. Em uma modalidade específica, o kit inclui um anticorpo anti-PG que se liga especificamente a uma região N-terminal de PG, um anticorpo anti-PG que se liga especificamente a uma região C-terminal de PG e, opcionalmente, reagentes adequados para realizar um ensaio diagnóstico, onde o anticorpo N-terminal específico é um anticorpo monoclonal anti-PG N-terminal como aqui descrito e/ou anticorpo C-terminal específico é um anticorpo monoclonal anti-PG C-terminal como aqui descrito.

[034] Os aspectos e vantagens das várias invenções aqui descritas ficarão aparentes a partir da descrição detalhada a seguir de suas modalidades exemplificadoras.

8. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[035] FIG. 1 fornece as sequências de aminoácidos de pré-progastrina, progastrina e produtos do processamento de progastrina incluindo G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, e o peptídeo flanqueador C-terminal, CTFP.

[036] FIG. 2 fornece o polipeptídeo e o polinucleotídeo correspondente, sequências das cadeias V_H e V_L para anticorpos monoclonais anti-hPG de murino exemplificadores: MAb 3 anti-hPG (SEQ ID NOS 16, 12, 17 e 13, respectivamente, em ordem de aparecimento) (FIG 2A, 2B), MAb 4 anti-hPG (SEQ ID NOS 18, 14, 19 e 15, respectivamente, em ordem de aparecimento) (FIG. 2C, 2D), MAb 8 anti-hPG (SEQ ID NOS 67, 59, 71 e 63, respectivamente, em ordem de aparecimento) (FIG. 2E, 2F), Mab 13 anti-hPG (SEQ ID NOS 68, 60, 72 e 64, respectivamente, em ordem de aparecimento) (FIG. 2G, 2H), MAb 16 anti-hPG (SEQ ID NOS 69, 61, 73 e 65, respectivamente, em ordem de aparecimento) (FIG. 2I, 2J), e MAb 19 anti-hPG (SEQ ID NOS 70, 62, 74 e 66, respectivamente, em ordem de aparecimento) (FIG. 2K,

2L), nos quais as três CDRs de cada cadeia estão sublinhadas.

[037] FIG. 3A-C fornece gráficos que ilustram as afinidades de ligação relativas (medidas como absorbância a 492 nm) em concentrações crescentes de anticorpo ($\mu\text{g/mL}$) de anticorpos monoclonais anti-hPG de murino exemplificadores, MAbs 1-4 (FIG. 3A); MAbs 5-14 e 20-23 (FIG. 3B); e MAbs 3 e 15-19 (FIG. 3C).

[038] FIG. 4 fornece um gráfico que ilustra a taxa de absorbância (densidade óptica) a 280 nm e 330 nm de quatro anticorpos monoclonais anti-hPG de murino exemplificadores quando comparados com uma amostra de controle de albumina sérica bovina (unidades arbitrárias).

[039] FIG. 5A-C fornece gráficos que ilustram a ligação de 23 anticorpos monoclonais anti-hPG de murino exemplificadores diferentes a 25 ou 50 ng de hPG quando comparados com: tampão (controle negativo), 250 ng de KLH (controle negativo) e peptídeos derivados do gene de gastrina (50 e 250 ng de CTFP, G17 ou G17-Gly (referido na figura como "G-Gly"), como indicado. FIG. 5A mostra a ligação de MAbs 1-4 anti-hPG, FIG. 5B mostra a ligação de MAbs 5-14 anti-hPG e 21-23, e FIG. 5C mostra a ligação de MAbs 3 e 15-20 anti-hPG.

[040] FIG. 6 fornece um gráfico que ilustra a ligação de um anticorpo policlonal anti-hPG N-terminal para hPG em concentrações crescentes de MAb3 anti-hPG.

[041] FIG. 7 fornece gráficos que ilustram a proliferação de linhagens celulares representativas de CRC tratadas com anticorpos monoclonais anti-hPG como se segue: SW480, HCT-116, LS174T, como indicado, tratadas com anticorpos monoclonais anti-hPG MAb 3 e MAb 4 exemplificadores (FIG. 7A, 7B, 7C, respectivamente, mostrando a alteração no número de células vivas no final do tratamento em relação ao início do tratamento (T0) com o anticorpo) ou um anticorpo policlonal anti-hPG (FIG. 7D, 7E, 7F, respectivamente, mostrando a alteração no número de células vivas no final do tratamento em relação

ao início do tratamento (T0) com o anticorpo); proliferação da linhagem celular SW620 de CRC com MAb 5 a MAb 23 anti-hPG (FIG. 7G, que mostra células vivas tratadas com anti-hPG como um percentual do número de células tratadas com anticorpo de controle no final do tratamento em relação ao início do tratamento (T0)); proliferação de células LS174T tratadas com MAb 8, 13, 14, 16 e 19 anti-hPG (FIG. 7H, que mostra células vivas tratadas com anti-hPG como um percentual do número de células tratadas com anticorpo de controle no final do tratamento em relação ao início do tratamento (T0)); e proliferação de células HCT-116 tratadas com anticorpos monoclonais anti-hPG MAb 8, 13, 14, 16, 19 (FIG. 7I, que mostra células vivas tratadas com anti-hPG como um percentual do número de células tratadas com anticorpo de controle no final do tratamento em relação ao início do tratamento (T0)).

[042] FIG. 8 fornece um gráfico que ilustra o número de células LS174T vivas 48 horas depois de 4 tratamentos com um anticorpo monoclonal de controle, MAb 8 anti-hPG (5 μ g/mL), MAb 8 anti-hPG pré-incubado com hPG, o anticorpo de controle pré-incubado com hPG ou hPG isolado.

[043] FIG. 9 fornece gráficos que ilustram o número de tumores por camundongo (FIG. 9A) e o peso e o tamanho médio do tumor (FIG. 9B) em camundongos tratados com anticorpos anti-hPG quando comparados com um anticorpo policlonal de controle.

9. DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES EXEMPLIFICADORAS

9.1 Descrição Detalhada

[044] A progastrina (PG) foi identificada inicialmente como precursora da gastrina, um hormônio peptídico intestinal que estimula a secreção ácida gástrica. A gastrina existe em várias formas moleculares diferentes (G17, G34, G17 estendido com glicina, G34 estendido com glicina) derivadas da progastrina. Veja a FIG.1. O gene da gastrina

codifica um produto com 101 aminoácidos, a preprogastrina. Uma primeira clivagem remove um resíduo de peptídeo de sinal com 21 aminoácidos (sublinhado na FIG. 1) e resulta em PG, um peptídeo com 80 aminoácidos. A sequência conhecida do polipeptídeo de PG humana (hPG) é fornecida na SEQ ID NO: 20. Como ilustrado na FIG. 1, os resíduos de aminoácidos de hPG são numerados de 1 a 80, com o resíduo mais amino sendo a posição 1. As sequências dentro dos primeiros 40 aminoácidos de progastrina são referidas como "N-terminais", enquanto que as sequências que caem dentro dos resíduos 41 a 80 são referidos como "C-terminais".

[045] Estudos recentes têm mostrado que os níveis de progastrina estão elevados em pacientes com CRC. Sob condições fisiológicas normais, a progastrina responde por menos do que 10% do total de peptídeos secretados em humanos. No câncer colorretal, os níveis de progastrina estão significativamente elevados no plasma e no tecido do tumor, possivelmente como resultado de expressão aumentada do gene de gastrina acoplado com um processamento incompleto do produto de gene. Um estudo mostrou níveis séricos de progastrina significativamente maiores em pacientes com CRC quando comparados com pacientes de controle, mas nenhuma diferença para as formas mais processadas de gastrina (Siddheshwar *et al.*, 2001, *Gut* 48:47-52). Em amostras de tumor de CRC testadas, 80 a 100% das amostras mostraram níveis elevados de PG. Veja, por exemplo, Ciccotosto *et al.*, 1995, *Gastroenterology* 109:1142-1153; Baldwin *et al.*, 1998, *Gut* 42:581-584; Van Solinge, 1993, *Gastroenterology* 104:1099-1107. O papel de PG em CRC foi adicionalmente comprovado pelos experimentos que mostram que camundongos que expressam PG recombinante humana tratados com o carcinogênico azoximetano tiveram números significativamente maiores de loci crípticos aberrantes, adenomas e adenocarcinomas no cólon quando comparados com

camundongos de tipo selvagem ou camundongos que expressam gastrinas amidadas (Singh *et al.* 2000, *Gastroenterology* 119:162-171).

[046] Recentemente, Hollande *et al.* demonstraram que a progastrina estimula a via da beta-catenina/Tcf4 pela repressão de ICAT, um regulador negativo da sinalização de beta-catenina/Tcf4 e que o bloqueio da progastrina leva a expressão de ICAT de novo. Veja WO 2007/135542. Embora não pretendendo estar ligado a qualquer teoria de operação, acredita-se que o bloqueio da sinalização da progastrina leve a repressão da proliferação induzida pela beta-catenina/Tcf4 como resultado da expressão aumentada de ICAT. Na ausência de sinalização dependente de PG continuada, a proliferação celular é inibida e a diferenciação celular e/ou a morte celular (incluindo a apoptose) é desencadeada.

[047] Apesar da necessidade urgente de novas abordagens clínicas para o tratamento e o diagnóstico de CRC, a evidência de que PG estimula a proliferação de células do tumor de CRC e apesar do interesse aumentado nas terapias com anticorpo monoclonal no tratamento do câncer, até agora não existem relatos que demonstrem qualquer anticorpo monoclonal capaz de bloquear a proliferação celular tumoral dependente de PG ou mesmo a ligação a PG. Tais anticorpos, apresentados aqui pela primeira vez, provaram ser difíceis de desenvolver. Como um primeiro desafio, os requerentes descobriram que a progastrina humana recombinante, que pode ser usada para gerar anticorpos policlonais anti-hPG, falhou em induzir uma resposta imunogênica monoclonal em camundongos de teste. Portanto, foi necessário projetar imunógenos que usem apenas fragmentos do peptídeo de PG para gerar os anticorpos específicos para a progastrina e nenhum outro produto de gene de gastrina. Mesmo quando clones de hibridoma forneceram anticorpos que se ligaram ao peptídeo antigênico, foi descoberto que a ligação ao peptídeo não era preeditiva da habilidade

de se ligar a PG, especificamente ou de modo algum. Como mostrado em mais detalhes nos Exemplos abaixo, vários hibridomas forneceram anticorpos que se ligaram ao peptídeo antigênico de PG usado como imunógeno, mas falharam em se ligar a PG. A presente descrição fornece anticorpos monoclonais anti-hPG que se ligam não apenas ao peptídeo antigênico contra o qual eles surgiram, mas que também se ligam especificamente a hPG. Quase surpreendentemente, os anticorpos monoclonais altamente específicos para hPG em relação aos seus produtos de processamento (por exemplo, G34, G34-Gly, G17, G17-Gly, CTFP) foram obtidos com antígenos que em alguns casos não são únicos para hPG, mas que incluem regiões da sequência de aminoácidos comuns a um ou mais produtos de processamento de progastrina. Além disso, também foi surpreendentemente descoberto que apesar do tamanho relativamente pequeno de hPG (80 aminoácidos) nem todos os anticorpos monoclonais anti-hPG, mate aqueles que exibem um alto grau de afinidade e especificidade por hPG, neutralizam sua atividade biológica.

Anticorpos monoclonais anti-hPG

[048] Os requerentes descobriram antígenos peptídicos úteis para originar anticorpos monoclonais anti-hPG. Peptídeos úteis para originar anticorpos monoclonais anti-hPG da presente descrição compreendem sequências específicas para a progastrina não encontradas nas formas mais processadas do polipeptídeo, tais como gastrinas prolongadas com glicina ou amidadas ou CTFP, mas também podem compreender sequências que são encontradas nas formas processadas de hPG. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG são originados contra um antígeno peptídico que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região N-terminal de hPG e são designados anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminais. Uma região antigênica específica exemplificadora que pode ser usada para construir

um imunógeno útil para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminais corresponde aos resíduos 1 a 14 de hPG (SWKPRSQSQPDAPLG (SEQ ID NO: 25)) acoplada a uma sequência ligante. Em outras modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG são originados contra um antígeno peptídico que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região C-terminal de hPG e são designados anticorpos monoclonais anti-hPG C-terminais. Uma região antigênica específica exemplificadora que pode ser usada para construir um imunógeno útil para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-hPG C-terminais corresponde aos resíduos 55 a 80 de hPG (SEQ ID NO: 27) acoplada a uma sequência ligante. Veja a Tabela 1.

[049] Anticorpos monoclonais anti-PG da presente descrição se ligam a PG e são úteis para detectar e isolar PG de misturas complexas. Adicionalmente, os anticorpos monoclonais anti-PG da descrição são adequados unicamente para aplicações terapêuticas e/ou diagnósticas para o câncer colorretal. Em várias modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG (1) se ligam especificamente a PG versus outros produtos de gene de gastrina, (2) possuem alta afinidade a hPG, (3) inibem a proliferação de célula de câncer colorretal *in vitro* e *in vivo*, (4) reduzem o tamanho e o número de tumores *in vivo*, (5) detectam PG em misturas complexas que contêm outros peptídeos derivados do gene de gastrina.

[050] O gene de gastrina é expresso e amplamente processado, para fornecer vários produtos de proteína que possuem papéis na homeostase normal. A progastrina, por outro lado, não é tipicamente detectável na circulação de indivíduos saudáveis. Os anticorpos monoclonais da presente descrição são pretendidos para atingir a progastrina, mas não outros peptídeos derivados do gene de gastrina. Consequentemente, os anticorpos monoclonais anti-hPG que se ligam especificamente a progastrina, de humanos e outros animais, mas não

outros produtos do gene de gastrina, tais como, mas não limitados a gastrinas prolongadas com glicina ou amidadas ou Peptídeo Flanqueador C-terminal (CTFP).

[051] A especificidade dos anticorpos monoclonais anti-hPG pode ser determinada usando um ELISA como a seguir. Placas de 96 poços são incubadas por uma noite a 4°C com as concentrações apropriadas de polipeptídeo de teste (por exemplo, 25 e 50 ng de PG recombinante humana e 50 e 250 ng de CTFP ou de outros produtos de gene derivados de gastrina) em Salina Tamponada com Fosfato (PBS), depois do que os poços são lavados três vezes com uma solução de lavagem (PBS e Tween-20 0,1%) e depois incubados por 2 horas a 22°C com 100 µL de solução de bloqueio (PBS, Tween-20 0,1%, Albumina Sérica Bovina 0,1% ou hidrolisado de caseína) por poço. Depois do bloqueio, os poços são lavados três vezes e o anticorpo a ser ensaiado (anticorpo de teste) é adicionado. 100 µL do anticorpo de teste (a 0,3 a 1 ng/mL) em PBS e Tween-20 0,1% são adicionados a cada poço. As placas são incubadas por 2 horas a 22°C, depois do que a solução de anticorpo de teste é descartada e substituída, depois uma etapa de lavagem (3 X 100 µL de solução de lavagem como observado acima) com a solução de bloqueio contendo um anticorpo secundário, uma anticorpo IgG (Fc) de cabra anti-camundongo acoplado com peroxidase de rábano silvestre. Depois de 1 hora de incubação com o anticorpo secundário, 100 µL de solução de substrato (por exemplo Fast OPD ou di-hidrocloreto de O-fenilenodiamina, disponibilizado por Sigma-Aldrich Co., preparado de acordo com as orientações do fabricante) são adicionados a cada poço e incubados no escuro por 20 minutos a 22°C. A reação é paralisada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 4N e a quantidade de substrato catalisado determinada pela medida da densidade óptica (O.D.) a 492 nm, A conversão do substrato é proporcional à quantidade de anticorpo primário (teste) ligado ao

antígeno. Os experimentos foram corridos em duplicata e as medidas de OD plotadas como uma função da concentração de antígeno. Os anticorpos de teste são classificados como específicos para PG se a O.D. medida estiver entre 0,2 e 1,5 para hPG e não houver sinal acima do fundo estatisticamente significativo com CTFP ou qualquer outro peptídeo derivado do gene de gastrina, onde o fundo é sinal médio dos poços de controle que contêm apenas PBS.

[052] Vários anticorpos monoclonais anti-hPG da presente descrição foram encontrados ser altamente específicos. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG exibem uma especificidade 100 vezes maior pela progastrina quando comparada com outros produtos de gene de gastrina. Em tais modalidades, são necessárias 100 vezes mais antígeno (por exemplo, gastrina prolongada com glicina ou amidada) para fornecer a mesma ligação como é observada quando o antígeno é a progastrina.

[053] Outros métodos para determinar a ligação incluem, mas não são limitados a um método imunofluorescente, um ensaio imunosorvente ligado à enzima (ELISA), um imunoensaio marcado com material radioativo (RIA), um ELISA sanduíche (Monoclonal Antibody Experiment Manual (publicado por Kodansha Scientific, 1987), Second Series Biochemical Experiment Course, Vol. 5, Immunobiochemistry Research Method, publicado por Tokyo Kagaku Dojin (1986)).

[054] Anticorpos monoclonais anti-hPG com alta afinidade por PG são desejáveis para usos terapêuticos e diagnósticos. Para certos usos, tais como usos terapêuticos, uma afinidade de pelo menos cerca de 100 nM é desejável, embora anticorpos que possuam afinidades maiores, por exemplo, afinidades de pelo menos cerca de 90 nM, 80 nM, 70 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, 10 pM, 1 pM ou até maior, podem ser desejáveis. Em algumas modalidades, os anticorpos

monoclonais se ligam especificamente a hPG com uma afinidade na faixa entre cerca de 1 pM a cerca de 100 nM, ou uma afinidade que varia entre qualquer um dos valores anteriores.

[055] A afinidade de anticorpos monoclonais anti-hPG por hPG pode ser determinada usando técnicas bem conhecidas ou aqui descritas, tais como, por exemplo, mas sem limitação, ELISA, calorimetria de titulação isotérmica (ITC), BIACore, Proteon ou ensaio de polarização fluorescente.

[056] Usando抗ígenos das regiões N ou C-terminais de hPG, os anticorpos que reconhecem diferentes epítópos de hPG podem ser gerados. O epítopo reconhecido por um anticorpo monoclonal dependerá do antígeno particular usado para originar o anticorpo e pode ser mapeado usando técnicas conhecidas pelo perito na técnica, tal como o rastreamento de alanina e a análise SPOT (veja Exemplos na seção abaixo). Por exemplo, o mapeamento de epítopo revela que MAb 2 e MAb 4 anti-hPG se ligam ao mesmo epítopo; MAb 1 e MAb 3 anti-hPG se ligam aproximadamente ao mesmo epítopo; MAb 17, MAb 18, MAb 19 e MAb 20 anti-hPG se ligam aproximadamente ao mesmo epítopo; MAb 15 e MAb 16 anti-hPG se ligam aproximadamente ao mesmo epítopo; MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb 9 e MAb 12 anti-hPG se ligam ao mesmo epítopo e se ligam aproximadamente ao mesmo epítopo como MAb 10 anti-hPG; e MAb 11 e MAb 14 anti-hPG se ligam aproximadamente ao mesmo epítopo.

[057] Se um anticorpo monoclonal anti-hPG reconhece ou não um epítopo particular, pode ser determinado usando um ensaio de competição como aqui descrito, no qual o epítopo ligado pelo anticorpo de referência é conhecido. Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal anti-hPG compete com um anticorpo de referência que se liga a um epítopo que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região N-terminal de hPG. Em modalidades

específicas, os anticorpos monoclonais anti-hPG competem com o anticorpo de referência que se liga a um epítopo que inclui os resíduos 10 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 28), resíduos 9 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 29), resíduos 4 a 10 de hPG (SEQ ID NO: 30), resíduos 2 a 10 de hPG (SEQ ID NO: 31), ou resíduos 2 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 32). Em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal anti-hPG compete com um anticorpo de referência que se liga a um epítopo que possui uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região C-terminal de hPG. Em modalidades específicas, os anticorpos monoclonais anti-hPG competem com o anticorpo de referência que se liga a um epítopo que inclui os resíduos 71 a 74 de hPG (SEQ ID NO: 33), resíduos 69 a 73 de hPG (SEQ ID NO: 34), resíduos 76 a 80 de hPG (SEQ ID NO: 35), ou resíduos 67 a 74 de hPG (SEQ ID NO: 36).

[058] Os anticorpos monoclonais anti-hPG podem ser neutralizantes. Embora não pretendendo estar ligado a qualquer teoria de operação, através da ligação de PG, anticorpos monoclonais anti-hPG neutralizantes são considerados bloquear ou inibir sua habilidade de interagir com seus parceiros de sinalização. Isso, por sua vez, inibe a via de transdução do sinal em células de tumor de câncer colorretal que de outra maneira poderiam levar à proliferação, diferenciação celular reduzida e morte celular. Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG neutralizantes se ligam a uma região N-terminal de hPG. Em modalidades específicas, os anticorpos monoclonais anti-hPG neutralizantes competem pela ligação de PG com MAb 5, MAb 6, MAb 7, MAb8, MAb9, MAb10, MAb11, MAb12, MAb13, MAb21, MAb 22, ou MAb23 anti-hPG.

[059] Um teste específico para saber se um anticorpo monoclonal anti-hPG é neutralizante pode ser realizado como a seguir. Células LS174T de CRC são semeadas em uma placa de 6 poços, como descrito no Exemplo 7 abaixo, em aproximadamente 50.000 células por

poço. As células são tratadas em intervalos de 12 horas por 48 horas com o anticorpo monoclonal anti-PG de teste ou com um anticorpo monoclonal de controle como observado no Exemplo 7, em concentrações de anticorpo de cerca de 5 µg/mL. Um anticorpo de teste é definido como neutralizante no ensaio se o número de células de câncer de CRC tratadas com o anticorpo de teste mostra uma redução estatisticamente diferente de pelo menos 10% no número de células sobreviventes comparado com o número de células tratadas com um anticorpo de controle não específico, usando o teste bicaudal de Mann-Whitney (com diferenças consideradas como significativas quando $p<0,05$). O número total de células é corrigido para o número de células no início do período de tratamento, referido como T0.

[060] Como usado aqui, um anticorpo (Ab) refere-se a uma molécula de imunoglobulina que se liga especificamente ou é imunologicamente reativa com um antígeno em particular e inclui anticorpos policlonais, monoclonais, geneticamente manipulados e formas modificadas de outra maneira de anticorpos, incluindo, mas não limitadas a anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos incluindo, por exemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rlgG e scFv. Em várias modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG compreendem toda ou uma porção de uma região constante de um anticorpo. Em algumas modalidades, a região constante é um isotipo selecionado entre: IgA (e.g., IgA1 ou IgA2), IgD, IgE, IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4), e IgM.

[061] A expressão "anticorpo monoclonal" como usada aqui não está limitada a anticorpos produzidos através da tecnologia do hibridoma. Um anticorpo monoclonal é derivado de um clone único, incluindo qualquer clone eucariótico, procariótico ou de fago, por qualquer meio disponível ou conhecido na técnica. Anticorpos monoclonais úteis com a presente descrição podem ser preparados

usando uma grande variedade de técnicas conhecidas incluindo o uso de hibridoma, tecnologias recombinante e de apresentação em fago ou uma combinação dessas. Em vários usos da presente descrição, incluindo o uso *in vivo* dos anticorpos monoclonais anti-hPG em humanos e ensaios de detecção *in vitro*, anticorpos quiméricos, primatizados, humanizados ou humanos podem ser adequadamente usados.

[062] A expressão "scFv" refere-se a um anticorpo Fv de cadeia simples no qual os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve de um anticorpo tradicional tenham sido unidos para formar uma cadeia.

[063] As referências a " V_H " referem-se à região variável de uma cadeia pesada de imunoglobulina de um anticorpo, incluindo a cadeia pesada de um Fv, scFv ou Fab. As referências a " V_L " referem-se à região variável de uma cadeia leve de imunoglobulina de um anticorpo, incluindo a cadeia leve de um Fv, scFv, dsFv ou Fab. Os anticorpos (Abs) e a imunoglobulinas (Igs) são glicoproteínas que possuem as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação para um alvo específico, as imunoglobulinas incluem anticorpos e outras moléculas semelhantes a anticorpo que carecem de especificidade pelo alvo. Anticorpos nativos e imunoglobulinas são geralmente glicoproteínas heterotetraméricas com cerca de 150.000 daltons, compostos de duas cadeias leve (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um domínio variável (V_H) seguido por vários domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade.

[064] Anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição compreendem regiões determinantes de complementaridade (CDRs). As CDRs também são conhecidas como regiões hipervariáveis em ambos os domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada. As porções mais altamente

conservadas dos domínios variáveis são chamadas de regiões estruturais (FR). Como é conhecido na técnica, a posição do aminoácido/limite que delinea uma região hipervariável de um anticorpo pode variar, dependendo do contexto e das várias definições conhecidas na técnica. Algumas posições dentro de um domínio variável podem ser vistas como posições hipervariáveis híbridas em que estas posições podem ser consideradas estar dentro de uma região hipervariável sob um conjunto de critérios enquanto possam ser consideradas fora de uma região hipervariável sob um conjunto diferente de critérios. A descrição fornece anticorpos que compreendem modificações nessas posições hipervariáveis híbridas. Os domínios variáveis das cadeias pesada e leve nativa compreendem cada uma quatro regiões FR, adotando amplamente uma configuração de fita β , conectadas por três CDRs que formam alças de conexão e, em alguns casos, fazem parte da estrutura de fita β . As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em intima proximidade pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação alvo de anticorpos (Veja Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987)).

[065] Vários anticorpos monoclonais anti-hPG que possuem alta especificidade e afinidade por hPG e boa atividade anti-tumor têm sido identificados e suas CDRs e cadeias variável pesada e leve têm sido sequenciadas. Domínios variáveis de cadeia pesada e leve de murino são referidos aqui como mV_H e mV_L seguido pelo número do anticorpo monoclonal correspondente, por exemplo, $mV_H.3$ e $mV_L.3$ para o MAb3 anti-hPG. Anticorpos monoclonais anti-hPG possuem três CDRs de cadeia leve variável e três CDRs de cadeia pesada variável, referidas como CDR1, 2, ou 3 de V_H e CDR1, 2, ou 3 de V_L , respectivamente, seguidas pelo número do anticorpo monoclonal anti-hPG exemplificador. Por exemplo, CDR1 de V_L de MAb 3 é denominada CDR1.3 de V_L e CDR1 de V_H de MAb 3 é denominada CDR1.3 de V_H . Similarmente,

os domínios variáveis de cadeia pesada e leve humanas são referidos aqui como hV_H e hV_L seguidos pelo número do anticorpo monoclonal correspondente.

[066] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG gerados contra uma porção N-terminal de hPG tem três CDRs de cadeia variável leve e três CDRs de cadeia variável pesada, em que a CDR1 de V_L é selecionada entre QSIVHSNGNTY ("V_L CDR 1.3"; SEQ ID NO: 4), QSLVHSSGVTY ("V_L CDR 1.4"; SEQ ID NO: 10), QSLLDSDGKTY ("V_L CDR 1.16"; SEQ ID NO: 50), e SQHRTYT ("V_L CDR 1.19"; SEQ ID NO: 51); a CDR2 de V_L é selecionada entre KVS ("V_L CDR 2.3" e ("V_L CDR 2.4"; SEQ ID NO: 5), LVS ("V_L CDR 2.16"; SEQ ID NO: 53), e VKKDGS ("V_L CDR 2.19"; SEQ ID NO: 54); a CDR3 de V_L é selecionada entre FQGSHVPFT ("V_L CDR 3.3"; SEQ ID NO: 6), SQSTHVPPT ("V_L CDR 3.4"; SEQ ID NO: 11), WQGTHSPYT ("V_L CDR 3.16"; SEQ ID NO: 57), e GVGDAIKGQSVFV ("V_L CDR 3.19"; SEQ ID NO: 58); a CDR1 de V_H é selecionada entre GYIFTSYW ("V_H CDR 1.3"; SEQ ID NO: 1), GYTFSSSW ("V_H CDR 1.4"; SEQ ID NO: 7), GYTFTSYY ("V_H CDR 1.16"; SEQ ID NO: 39), e GYSITSDYA ("V_H CDR 1.19"; SEQ ID NO: 40); a CDR2 de V_H é selecionada entre FYPGNSDS ("V_H CDR 2.3"; SEQ ID NO: 2), FLPGSGST ("V_H CDR 2.4"; SEQ ID NO: 8), INPSNGGT ("V_H CDR 2.16"; SEQ ID NO: 43), e ISFSGYT ("V_H CDR 2.19"; SEQ ID NO: 44); e a CDR3 de V_H é selecionada entre TRRDSPQY ("V_H CDR 3.3"; SEQ ID NO: 3), ATDGNYDWFA ("V_H CDR 3.4" SEQ ID NO: 9), TRGGYYPFDY ("V_H CDR 3.16"; SEQ ID NO: 47), e AREVNYGDSYHFDY ("V_H CDR 3.19"; SEQ ID NO: 48). Veja Tabela 1A.

[067] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG originados contra uma porção C-terminal de hPG possuem três CDRs de cadeia variável leve e três CDRs de cadeia variável pesada, em que a CDR1 de V_L é selecionada entre KSLRHTKGITF ("V_L CDR

1.8"; SEQ ID NO: 49) e QSLLDSDGKTY ("V_L CDR 1.13"; SEQ ID NO: 50); a CDR2 de V_L é selecionada entre QMS ("V_L CDR 2.8"; SEQ ID NO: 52) e LVS ("V_L CDR 2.13"; SEQ ID NO: 53); a CDR3 de V_L é selecionada entre AQNLELPLT ("V_L CDR 3.8"; SEQ ID NO: 55) e WQGTHFPQT ("V_L CDR 3.13"; SEQ ID NO: 56); a CDR1 de V_H é selecionada entre GFTFTTYA ("V_H CDR 1.8"; SEQ ID NO: 37) e GFIFSSYVG ("V_H CDR 1.13"; SEQ ID NO: 38); a CDR2 de V_H é selecionada entre ISSGGTYT ("V_H CDR 2.8"; SEQ ID NO: 41) e INTFGDRT ("V_H CDR 2.13"; SEQ ID NO: 42); e a CDR3 de V_H é selecionada entre ATQGNYSLDF ("V_H CDR 3.8"; SEQ ID NO: 45) e ARGTGTY ("V_H CDR 3.13"; SEQ ID NO: 46). Veja Tabela 1B.

Tabela 1A Anticorpos Monoclonais anti-hPG N-terminais										
Imunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Sequências de CDR de Murino	Sequências de V_H e V_L de Murino	Sequências de V_H e V_L Humanizadas (projetadas)					
N1	43B9G11	MAb1								
N1	WE5H2G7	MAb2								
N2	6B5B11C10	MAb3	V_H CDR 1.3 GYIFTSYW (SEQ ID NO: 1) V_H CDR 2.3 FYPGNSDS (SEQ ID NO: 2) V_H CDR 3.3 TRRDSPQY (SEQ ID NO: 3) V_L CDR 1.3 QSIVHSNGNTY (SEQ ID NO: 4) V_L CDR 2.3 KVS (SEQ ID NO: 5) V_L CDR 3.3 FQGSHVPFT (SEQ ID NO: 6)	mV_H 3 (SEQ ID NO: 12) mV_L 3 (SEQ ID NO: 13)	hV_H 3 (SEQ ID NO: 21) hV_L 3 (SEQ ID NO: 22)					
N2	20D2C3G2	MAb4	V_H CDR 1.4 GYTFSSSW (SEQ ID NO: 7) V_H CDR 2.4 FLPGSGST (SEQ ID NO: 8) V_H CDR 3.4 ATDGNYDWFAY (SEQ ID NO: 9) V_L CDR 1.4 QSLVHSSGVTY (SEQ ID NO: 10) V_L CDR 2.4 KVS (SEQ ID NO: 5) V_L CDR 3.4 SQSTHVPPT (SEQ ID NO: 11)	mV_H 4 (SEQ ID NO: 14) mV_L 4 (SEQ ID NO: 15)	hV_H 4 (SEQ ID NO: 23) hV_L 4 (SEQ ID NO: 24)					
N2	1E9A4A4 (I-4376)	MAb15								
N2	1E9D9B6	MAb16	V_H CDR 1.16 GYTFTSYY (SEQ ID NO: 39) V_H CDR 2.16 INPSNGGT (SEQ ID NO: 43) V_H CDR 3.16 TRGGYYPFDY (SEQ ID NO: 47) V_L CDR 1.16 QSLLDSDGKTY (SEQ ID NO: 50) V_L CDR 2.16 LVS (SEQ ID NO: 53) V_L CDR 3.16 WQGTHSPYT (SEQ ID NO: 57)	mV_H 16 (SEQ ID NO: 61) mV_L 16 (SEQ ID NO: 65)	hV_H 16a (SEQ ID NO: 84) hV_H 16b (SEQ ID NO: 86) hV_H 16c (SEQ ID NO: 88) hV_L 16a (SEQ ID NO: 85) hV_L 16b (SEQ ID NO: 87) hV_L 16c (SEQ ID NO: 89)					
N2	1C8D10F5	MAb17								
N2	1A7C3F11	MAb18								
N2	1B3B4F11	MAb19	V_H CDR 1.19 GYSITSDYA (SEQ ID NO: 40) V_H CDR 2.19 ISFSGYT (SEQ ID NO: 44) V_H CDR 3.19 AREVNYGDSYHFDY (SEQ ID NO: 48) V_L CDR 1.19 SQHRTYT (SEQ ID NO: 51) V_L CDR 2.19 VKKDGS (SEQ ID NO: 54) V_L CDR 3.19 GVGDAIKGQSVF (SEQ ID NO: 58)	mV_H 19 (SEQ ID NO: 62) mV_L 19 (SEQ ID NO: 66)	hV_H 19a (SEQ ID NO: 90) hV_H 19b (SEQ ID NO: 92) hV_H 19c (SEQ ID NO: 94) hV_L 19a (SEQ ID NO: 91) hV_L 19b (SEQ ID NO: 93) hV_L 19c (SEQ ID NO: 95)					
N2	1C11F5E8	MAb20								
Imunógeno N1 = SWKPRSQQPDA PLG Ahx Cys BSA, também representado como (SEQ ID NO: 25) Ahx Cys BSA										
Imunógeno N2 = SWKPRSQQPDA PLG Ahx Cys KLH, também representado como (SEQ ID NO: 25) Ahx Cys KLH										

[068] Na Tabela 1A, todas as sequências de aminoácidos são representadas usando a orientação convencional N→C. Para cada imunógeno, o peptídeo de progastrina foi sintetizado com um ligante de um resíduo de ácido aminohexanóico (Ahx) seguidos por uma cisteína, que foi conjugada ou com um veículo de albumina sérica bovina ("BSA") ou hemocianina de keyhole limpet ("KLH").

Tabela 1B Anticorpos Monoclonais anti-hPG C-terminais										
Imunógeno	Hibridoma (Depósito #)	MAb	Sequências de CDR de Murino	Sequências de V _H e V _L de Murino	Sequências de V _H e V _L Humanizadas (projetadas)					
C1	1B4A11D11 (I-4371)	MAb5								
C1	1B6A11F2 (I-4372)	MAb6								
C1	1B11E4B11 (I-4373)	MAb7								
C1	1C10D3B9	MAb8	V _H CDR 1.8 GFTFTTYA (SEQ ID NO: 37) V _H CDR 2.8 ISSGGTYT (SEQ ID NO: 41) V _H CDR 3.8 ATQGNYSLDF (SEQ ID NO: 45) V _L CDR 1.8 KSLRHTKGITF (SEQ ID NO: 49) V _L CDR 2.8 QMS (SEQ ID NO: 52) V _L CDR 3.8 AQNLELPLT (SEQ ID NO: 55)	mV _H .8 (SEQ ID NO: 59) mV _L .8 (SEQ ID NO: 63)	hV _H 8a (SEQ ID NO: 75) hV _H 8b (SEQ ID NO: 77) hV _H 8c (SEQ ID NO: 79) hV _L 8a (SEQ ID NO: 76) hV _L 8b (SEQ ID NO: 78) hV _L 8c (SEQ ID NO: 76)					
C1	1D8F5B3	MAb9								
C1	1E1C7B4	MAb10								
C1	2B4C8C8 (I-4374)	MAb11								
C1	2B11E6G4 (I-4375)	MAb12								
C1	2C6C3C7	MAb13	V _H CDR 1.13 GFIFSSYG (SEQ ID NO: 38) V _H CDR 2.13 INTFGDRT (SEQ ID NO: 42) V _H CDR 3.13 ARGTGTY (SEQ ID NO: 46) V _L CDR 1.13 QSLLSDGKTY (SEQ ID NO: 50) V _L CDR 2.13 LVS (SEQ ID NO: 53) V _L CDR 3.13 WQGTHFPQT (SEQ ID NO: 56)	mV _H .13 (SEQ ID NO: 60) mV _L .13 (SEQ ID NO: 64)	hV _H .13a (SEQ ID NO: 80) hV _H .13b (SEQ ID NO: 82) hV _L .13a (SEQ ID NO: 81) hV _L .13b (SEQ ID NO: 83)					
C1	2H9F4B7	MAb14								
C2	1F11F5E10	MAb21								
C2	1F11F5G9	MAb22								
C2	1A11F2C9	MAb23								
Imunógeno C1 = KLH Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, também representado como KLH Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO: 27)										
Imunógeno C2 = DT Cys Ahx Ahx QGPWLEEEEAYGWMDFGRRSAEDEN, também representado como DT Cys Ahx Ahx (SEQ ID NO: 27)										

[069] Na Tabela 1B, todas as sequências de aminoácidos são representadas usando a orientação convencional N→C. Para cada imunógeno, o peptídeo de progastrina foi sintetizado com um ligante de dois resíduos de ácido aminohexanóico (Ahx) seguido por uma cisteína, que foi conjugada ou com um veículo de hemocianina de keyhole limpet ("KLH") ou de toxina diftérica ("DT").

[070] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.3, V_H CDR2.3 e V_H CDR3.3. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_H.3$ (SEQ ID NO: 12). Veja a FIG. 2A.

[071] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_L CDR1.3, V_L CDR2.3 e V_L CDR3.3. Em uma modalidade específica, a cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_L.3$ (SEQ ID NO: 13). Veja a FIG. 2B.

[072] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.4, V_H CDR2.4 e V_H CDR3.4. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência que corresponde a $mV_H.4$ (SEQ ID NO: 14). Veja a FIG. 2C.

[073] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_L CDR1.4, V_L CDR2.4 e V_L CDR3.4. Em uma modalidade específica, a cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_L.4$ (SEQ ID NO: 15). Veja a FIG. 2D.

[074] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.8, V_H CDR2.8 e V_H CDR3.8. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência que corresponde a $mV_H.8$ (SEQ ID NO:

59). Veja a FIG. 2E.

[075] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_L CDR1.8, V_L CDR2.8 e V_L CDR3.8. Em uma modalidade específica, a cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a mV_L .8 (SEQ ID NO: 63). Veja a FIG. 2F.

[076] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.13, V_H CDR2.13 e V_H CDR3.13. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência que corresponde a mV_H .13 (SEQ ID NO: 60). Veja a FIG. 2G.

[077] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_L CDR1.13, V_L CDR2.13 e V_L CDR3.13. Em uma modalidade específica, a cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a mV_L .13 (SEQ ID NO: 64). Veja a FIG. 2H.

[078] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.16, V_H CDR2.16 e V_H CDR3.16. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência que corresponde a mV_H .16 (SEQ ID NO: 61). Veja a FIG. 2I.

[079] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_L CDR1.16, V_L CDR2.16 e V_L CDR3.16. Em uma modalidade específica, a cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a mV_L .16 (SEQ ID NO: 65). Veja a FIG. 2J.

[080] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.19, V_H CDR2.19 e V_H CDR3.19. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência que corresponde a mV_H .19

(SEQ ID NO: 62). Veja a FIG. 2K.

[081] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_L CDR1.19, V_L CDR2.19 e V_L CDR3.19. Em uma modalidade específica, a cadeia V_L do anticorpo monoclonal anti-hPG tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_L.19$ (SEQ ID NO: 66). Veja a FIG. 2L.

[082] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.3, V_H CDR2.3 e V_H CDR3.3 e as CDRs da cadeia V_L são V_L CDR1.3, V_L CDR2.3 e V_L CDR3.3. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-PG tem uma sequência que corresponde a $mV_H.3$ (SEQ ID NO: 12) e a cadeia V_L tem uma sequência que corresponde a $mV_L.3$ (SEQ ID NO: 13).

[083] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.4, V_H CDR2.4 e V_H CDR3.4 e as CDRs da cadeia V_L são V_L CDR1.4, V_L CDR2.4 e V_L CDR3.4. Em uma modalidade específica, a cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-PG tem uma sequência que corresponde a $mV_H.4$ (SEQ ID NO: 14) e a cadeia V_L tem uma sequência que corresponde a $mV_L.4$ (SEQ ID NO: 15).

[084] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.8, V_H CDR2.8 e V_H CDR3.8 e as CDRs da cadeia V_L são V_L CDR1.8, V_L CDR2.8 e V_L CDR3.8. Em uma modalidade específica, o anticorpo monoclonal anti-PG é um MAb 8 anti-hPG aqui descrito e compreende uma sequência aminoácidos que corresponde a $mV_H.8$ (SEQ ID NO: 59) e uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_L.8$ (SEQ ID NO: 63).

[085] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.13, V_H CDR2.13 e V_H CDR3.13 e as CDRs da cadeia V_L são V_L CDR1.13, V_L CDR2.13 e

V_L CDR3.13. Em uma modalidade específica, o anticorpo monoclonal anti-PG é um MAb 13 anti-hPG aqui descrito e compreende uma sequência aminoácidos que corresponde a $mV_H.13$ (SEQ ID NO: 60) e uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_L.13$ (SEQ ID NO: 64).

[086] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.16, V_H CDR2.16 e V_H CDR3.16 e as CDRs da cadeia V_L são V_L CDR1.16, V_L CDR2.16 e V_L CDR3.16. Em uma modalidade específica, o anticorpo monoclonal anti-PG é um MAb 16 anti-hPG aqui descrito e compreende uma sequência aminoácidos que corresponde a $mV_H.16$ (SEQ ID NO: 61) e uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_L.16$ (SEQ ID NO: 65).

[087] Em algumas modalidades, as CDRs da cadeia V_H do anticorpo monoclonal anti-hPG são V_H CDR1.19, V_H CDR2.19 e V_H CDR3.19 e as CDRs da cadeia V_L são V_L CDR1.19, V_L CDR2.19 e V_L CDR3.19. Em uma modalidade específica, o anticorpo monoclonal anti-PG é um MAb 19 anti-hPG aqui descrito e compreende uma sequência aminoácidos que corresponde a $mV_H.19$ (SEQ ID NO: 62) e uma sequência de aminoácidos que corresponde a $mV_L.19$ (SEQ ID NO: 66).

[088] Anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição incluem moléculas intactas e fragmentos de anticorpo (tais como, por exemplo, fragmentos Fab e $F(ab')_2$) que são capazes de se ligar especificamente a hPG. Os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ carecem do fragmento Fc do anticorpo intacto, são depurados mais rapidamente da circulação do animal ou planta e podem ter menos ligação específica para o tecido do que o anticorpo intacto (Wahl *et al.*, 1983, *J. Nucl. Med.* 24:316). Os fragmentos de anticorpo são, portanto, úteis nas aplicações terapêuticas entre outras aplicações.

[089] A expressão "fragmento de anticorpo" refere-se a uma porção de um anticorpo de extensão completa, geralmente a região de ligação ao alvo ou variável. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 e Fv. Um fragmento "Fv" é um fragmento mínimo de anticorpo que contém o sítio de reconhecimento e de ligação ao alvo completo. Essa região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em uma estreita associação, não covalente (dímero de V_H e V_L). É nessa configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação ao alvo sobre a superfície do dímero de V_H e V_L . Frequentemente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação ao alvo do anticorpo. Entretanto, em alguns exemplos, até um domínio variável único (ou metade de um Fv que compreenda apenas três CDRs específicas para o alvo) pode ter a habilidade de reconhecer e se ligar ao alvo, embora com uma afinidade menor do que a do sítio de ligação inteiro. Fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "scFv" compreendem os domínios V_H e V_L do anticorpo, em que esses domínios estão presentes em uma única cadeia de polipeptídeo. Geralmente, o polipeptídeo de Fv compreende adicionalmente um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L o que possibilita que o scFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. "Anticorpos de domínio único" são compostos por domínios V_H ou V_L únicos que exibem afinidade suficiente a hPG. Em uma modalidade específica, o anticorpo de domínio único é um anticorpo camelizado (Veja, por exemplo, Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25–38).

[090] O fragmento Fab contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH_1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos na terminação carboxila do domínio CH_1 da cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região da dobradiça do anticorpo. Fragmentos

F(ab') são produzidos pela clivagem da ligação de disulfeto nas cisteínas da dobradiça do produto de digestão pela pepsina F(ab')₂. Acoplamentos químicos adicionais de fragmentos de anticorpo são conhecidos por aqueles versados na técnica.

[091] Os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição podem ser anticorpos quiméricos. A expressão anticorpo "químérico" como usada aqui refere-se a um anticorpo que possui sequências variáveis derivadas de imunoglobulinas não humanas, tais como de anticorpo de rato ou camundongo e regiões constantes de imunoglobulinas humanas, escolhidas tipicamente de um modelo de imunoglobulina humana. Métodos para a produção de anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Morrison, 1985, *Science* 229(4719):1202-7; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214-221; Gillies *et al.*, 1985, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; Pat. U.S. Nos. 5.807.715; 4.816.567; e 4.816.397, que estão incorporadas aqui por referência em suas totalidades.

[092] Os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição podem ser humanizados. Formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo de murino) são imunoglobulinas quiméricas, cadeias ou fragmentos de imunoglobulinas (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subsequências de anticorpo que se liguem ao alvo) que contêm as sequências mínimas derivadas de imunoglobulinas não humanas. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente tudo de pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões de CDR correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência consenso de imunoglobulina humana e podem ser referidas como "CDR enxertada". O anticorpo humanizado também pode compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc),

tipicamente aquela de uma sequência consenso de imunoglobulina humana. Métodos para a humanização de anticorpo, incluindo métodos de planejamento de anticorpos humanizados são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Lefranc *et al.*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77; Lefranc *et al.*, 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-7; Patentes U.S. Nos: 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e 6.180.370 de Queen *et al.*; EP239400; Publicação PCT WO 91/09967; Patente U.S. No. 5.225.539; EP592106; EP519596; Padlan, 1991, Mol. Immunol., 28:489-498; Studnicka *et al.*, 1994, Prot. Eng. 7:805-814; Roguska *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:969-973; e Patente U.S. No. 5.565.332, todos incorporados por referência em suas totalidades.

[093] As sequências dos anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados foram projetados a partir dos anticorpos monoclonais anti-hPG de murino da presente descrição como descrito nos Exemplos abaixo. Modalidades específicas dos anticorpos humanizados incluem anticorpos que compreendem: (1) quaisquer três CDRs de VL e quaisquer três CDRs de VH aqui descritas; (2) uma região variável de cadeia pesada que compreenda uma sequência de aminoácido que corresponde a SEQ ID NO: 21 e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 22; (3) uma região variável de cadeia pesada que compreenda uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 23 e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 24; (4) uma região variável de cadeia pesada que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 75, 77 e 79 e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 76 e 78; (5) uma região variável de

cadeia pesada que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 80 e 82 e uma região variável de cadeia leve que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 81 e 83; (6) uma região variável de cadeia pesada que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 84, 86 e 88 e uma região variável de cadeia leve que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 85, 87 e 89; (7) uma região variável de cadeia pesada que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 90, 92 e 94 e uma região variável de cadeia leve que compreenda uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 91, 93 e 95.

[094] Os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição podem ser primatizados. A expressão "anticorpo primatizado" refere-se a um anticorpo que compreende regiões variáveis de macaco e regiões constantes humanas. Métodos para a produção de anticorpos primatizados são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.658.570; 5.681.722 e 5.693.780, que estão incorporadas aqui por referência em sua totalidade.

[095] Incluídos dentro de anticorpos monoclonais anti-hPG estão os anticorpos que competem com um anticorpo de referência, tal como, por exemplo, um anticorpo policlonal anti-hPG ou qualquer um dos anticorpos monoclonais anti-hPG aqui descritos. Os anticorpos que competem com os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição são úteis em uma variedade de aplicações diagnósticas e terapêuticas. Modalidades específicas de anticorpos monoclonais anti-hPG de referência incluem os anticorpos aqui descritos, por exemplo, mas não limitados a: anticorpos nos quais a cadeia VH tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 12 (mVH.3) e a cadeia VL

tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 13 (mVL.3); e anticorpos nos quais a cadeia VH tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 14 (mVH.4) e a cadeia VL tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 15 (mVL.4), anticorpos nos quais a cadeia VH tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 59 (mVH.8) e a cadeia VL tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 63 (mVL.8); anticorpos nos quais a cadeia VH tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 60 (mVH.13) e a cadeia VL tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 64 (mVL.13); anticorpos nos quais a cadeia VH tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 61 (mVH.16) e a cadeia VL tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 65 (mVL.16); anticorpos nos quais a cadeia VH tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 62 (mVH.19) e a cadeia VL tem uma sequência de aminoácidos que corresponde a SEQ ID NO: 66 (mVL.19) ou qualquer combinação de cadeias VH e VL aqui descritas.

[096] Anticorpos de referência adequados também incluem os anticorpos produzidos por um hibridoma selecionado do grupo que consiste em 43B9G11, WE5H2G7, 6B5B11C10, 20D2C3G2, 1B4A11D11, 1B6A11F2, 1B11E4B11, 1C10D3B9, 1D8F5B3, 1E1C7B4, 2B4C8C8, 2B11E6G4, 2C6C3C7, 2H9F4B7, 1E9A4A4, 1E9D9B6, 1C8D10F5, 1A7C3F11, 1B3B4F11, 1C11F5E8, 1F11F5E10, 1F11F5G9, e 1A11F2C9; anticorpos que se ligam a um epítopo que inclui os resíduos 10 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 28), resíduos 9 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 29), resíduos 4 a 10 de hPG (SEQ ID NO: 30), resíduos 2 a 10 de hPG (SEQ ID NO: 31), ou resíduos 2 a 14 de hPG (SEQ ID NO: 32); e anticorpos que se ligam a um epítopo que inclui os resíduos 71 a 74 de hPG (SEQ ID NO: 33), resíduos 69 a 73 de hPG

(SEQ ID NO: 34), resíduos 76 a 80 de hPG (SEQ ID NO: 35), ou resíduos 67 a 74 de hPG (SEQ ID NO: 36).

[097] A habilidade para competir com um anticorpo monoclonal da presente descrição pela ligação a PG, por exemplo, hPG, pode ser testada usando um ensaio de competição como a seguir. Placas de 96 poços são revestidas com um anticorpo de captura (anticorpo policlonal ou monoclonal que reconheça uma região N ou C-terminal de progastrina que difira do epítopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal de referência), em uma concentração a ser escolhida dentro da faixa de 1 a 10 µg/mL, por uma noite a 4°C (0,1 a 1µg/poço). Depois de bloquear com Tween-20 0,1%/BSA 0,1% em PBS (tampão de bloqueio) por 2 h a 22°C, a progastrina recombinante humana é adicionada em uma concentração de 10 pM a 1 nM (10 a 1000 pg/poço) e incubada por 2 h a 22°C. Depois, um anticorpo monoclonal anti-hPG de referência biotinilado ou uma mistura contendo o anticorpo monoclonal de referência é adicionado junto com concentrações crescentes de anticorpos de teste não marcados e incubado por 1 h a 22°C. Depois de lavar, a detecção é realizada pela incubação por 1 h a 22°C com um substrato fluorogênico para a peroxidase de rábano silvestre, seguida pela quantificação de unidades relativas de luz (RLU) em um luminômetro. Os ensaios são realizados em duplicata. Anticorpos que competem com um anticorpo monoclonal anti-hPG de referência da presente descrição inibem a ligação do anticorpo de referência a hPG. Um anticorpo que se ligue ao mesmo epítopo como os anticorpos de controle serão capazes de competir efetivamente pela ligação e, portanto, reduzirão significativamente (por exemplo, em pelo menos 50%) a ligação do anticorpo de referência, como evidenciado pela redução no marcador ligado. A reatividade dos anticorpos de referência (marcados) na ausência de um anticorpo completamente irrelevante poderá ser o controle de maior valor. O controle de menor valor poderá

ser obtido pela incubação de anticorpos de teste não marcados com células que expressam a progastrina e depois incubar a mistura de célula/anticorpo com anticorpos de controle marcados exatamente do mesmo tipo, quando a competição ocorrerá e reduzirá a ligação dos anticorpos marcados. Em um ensaio de teste, uma redução significativa na reatividade do anticorpo marcado na presença do anticorpo de teste é indicativa de um anticorpo de teste que reconhece substancialmente o mesmo epítopo.

[098] A inibição da ligação pode ser expressa como uma constante de inibição ou K_i , que é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$K_i = IC50 / (1 + [\text{concentração de Ab de referência}] / K_d)$$

[099] Onde a IC50 do anticorpo de teste é a concentração do anticorpo de teste que fornece uma redução de 50% na ligação do anticorpo de referência e K_d é a constante de dissociação do anticorpo de referência, uma medida de sua afinidade pela progastrina. Os anticorpos que competem com os anticorpos monoclonais anti-hPG aqui descritos podem ter uma K_i entre 10 pM a 10 nM sob as condições de ensaio aqui descritas.

[0100] Em várias modalidades, um anticorpo monoclonal anti-hPG não marcado da descrição reduz a ligação de um anticorpo de referência marcado em pelo menos 40%, em pelo menos 50%, em pelo menos 60%, em pelo menos 70%, em pelo menos 80%, em pelo menos 90%, em 100% ou em um percentual que varie entre qualquer um dos valores precedentes (por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição reduz a ligação do anticorpo de referência marcado em 50% a 70%), quando o anticorpo monoclonal anti-hPG é usado em uma concentração de 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 0,08 $\mu\text{g/mL}$, 0,4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ ou em uma concentração que varie entre qualquer um dos valores precedentes (por exemplo, em uma concentração que varia entre 2 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$).

[0101] Na realização de um estudo de competição de anticorpo entre um anticorpo de referência e qualquer anticorpo de teste (independente da espécie ou do isotipo), marca-se primeiro a referência com um marcador detectável, tal como biotina ou um marcador enzimático (ou até radioativo) para possibilitar a subsequente identificação. Nesse caso, o anticorpo de referência marcado (em concentrações fixas ou crescentes) é incubado com uma quantidade de progastrina conhecida. O anticorpo de teste não marcado é então adicionado ao complexo pré-ligado de progastrina e anticorpo marcado. A intensidade do marcador ligado é medida. Se o anticorpo de teste compete com o anticorpo marcado pela ligação a um epítopo superposto, a intensidade estará diminuída em relação à ligação do anticorpo de controle marcado na ausência do anticorpo de teste.

[0102] Os ensaios de competição são conhecidos e podem ser adaptados para fornecer resultados comparáveis com o ensaio acima descrito. O ensaio pode ser qualquer um de uma faixa de ensaios imunológicos baseados na competição com o anticorpo e os anticorpos de referência serão detectados por meio de seu marcador de detecção, por exemplo, pelo uso de estreptavidina no caso de anticorpos biotinilados ou pelo uso de um substrato cromogênico em conexão com um marcador enzimático (tal como o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) com uma enzima peroxidase) ou simplesmente pela detecção do marcador radioativo ou de um marcador fluorescente.

[0103] Também estão incluídos aqui anticorpos monoclonais anti-hPG que são derivatizados, covalentemente modificados ou conjugados com outras moléculas, para uso em aplicações diagnósticas e terapêuticas. Por exemplo, mas não como meio de limitação, anticorpos derivatizados incluem anticorpos que tenham sido modificados, por exemplo, pela glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos,

clivagem proteolítica, ligação a um ligante celular ou outra proteína, etc. Qualquer uma das numerosas modificações químicas pode ser realizada por técnicas conhecidas incluindo, mas não limitadas a clivagem química, acetilação, formilação, síntese metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, o derivado pode conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

[0104] Em outro exemplo, os anticorpos da presente descrição podem ser acoplados a porções de poli(etilenoglicol) (PEG). Em uma modalidade específica, o anticorpo é um fragmento de anticorpo e as porções de PEG são acopladas através de qualquer aminoácido disponível da cadeia lateral ou grupo funcional amino-terminal localizado no fragmento de anticorpo, por exemplo, qualquer grupo amino, imino, tiol, hidróxi ou carboxila livre. Tais aminoácidos podem ocorrer naturalmente no fragmento de anticorpo ou podem ser manipulados no fragmento usando métodos de DNA recombinante. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 5.219.996. Sítios múltiplos podem ser usados para acoplar duas ou mais moléculas de PEG. As moléculas de PEG podem ser ligadas covalentemente através de um grupo tiol de pelo menos um resíduo de cisteína localizado no fragmento do anticorpo. Onde for usado um grupo tiol como ponto de acoplamento, moléculas efetoras apropriadamente ativadas, por exemplo, derivados seletivos para tiol tais como maleimidas e derivados de cisteína podem ser usadas.

[0105] Em um exemplo específico, um anticorpo monoclonal anti-hOG conjugado é um fragmento Fab' modificado que é PEGuilado, isto é, tem PEG (poli(etilenoglicol)) acoplado covalentemente a ele, por exemplo, de acordo com o método descrito em EP0948544. Veja também Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, New York, 1992); Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications, (J. Milton

Harris and S. Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C., 1997); e Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M. Aslam and A. Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998); e Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54:531-545. PEG pode ser acoplado a uma cisteína da região da dobradiça. Em um exemplo, um fragmento Fab' modificado com PEG tem um grupo maleimida covalentemente acoplado a um grupo tiol único em uma região de dobradiça modificada. Um resíduo de lisina pode ser covalentemente acoplado ao grupo maleimida e a cada um dos grupos amina sobre o resíduo de lisina pode estar acoplado um polímero de metoxipoli(etilenoglicol) que possui um peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons. O peso molecular total do PEG acoplado ao fragmento Fab' pode, portanto, ser de aproximadamente 40.000 Da.

[0106] Anticorpos monoclonais anti-hPG incluem anticorpos marcados, úteis para aplicações diagnósticas. Os anticorpos podem ser usados no diagnóstico, por exemplo, para detectar a expressão de um alvo de interesse em células específicas, tecidos ou soro; ou para monitorar o desenvolvimento ou a progressão de uma resposta imunológica como parte de um procedimento de teste clínico para, por exemplo, determinar a eficácia de um dado regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada pelo acoplamento do anticorpo a uma substância detectável ou "marcador". Um marcador pode ser conjugado diretamente ou indiretamente a um anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição. O marcador pode ser ele próprio detectável (por exemplo, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, podem catalisar uma alteração química de um composto de substrato ou composição que seja detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, metais

que emitem pósitrons usando várias tomografias por emissão de pósitron e íons de metal paramagnético não radioativo. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada diretamente com o anticorpo (ou seu fragmento) ou indiretamente, através de um intermediário (tal como, por exemplo, um ligante conhecido na técnica) usando técnicas conhecidas. Exemplos de marcadores enzimáticos incluem as luciferases (por exemplo, luciferase de vagalume e luciferase bacteriana; Patente U.S. No. 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinodionas, malato desidrogenase, urease, peroxidase de rábano silvestre (HRPO), fosfatase alcalina, β -galactosidase, acetilcolinesterase, glicoamilase, lisozima, sacarideo oxidases (e.g., glicose oxidase, galactose oxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase), oxidases heterocíclicas (tais como uricase e xantina oxidase), lactoperoxidase, microperoxidase e semelhantes. Exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansil, cloreto de dimetilamina-1-naftalenosulfonila ou ficoeritrina e semelhantes; um exemplo de material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem a luciferase, luciferina e equorina; exemplos de materiais isotópicos adequados incluem ^{13}C , ^{15}N , e deutério; e exemplos de materiais radioativos adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In ou ^{99}Tc .

[0107] Anticorpos monoclonais anti-hPG de todas as espécies de origem estão incluídos na presente invenção. Anticorpos naturais exemplificadores não limitantes incluem anticorpos derivados de humanos, símios, galinhas, cabras, coelhos e roedores (por exemplo, ratos, camundongos e hamsters) (Veja, por exemplo, Lonberg *et al.*, WO93/12227; Pat. U.S. No. 5.545.806; and Kucherlapati, *et al.*, WO91/10741; Pat. U.S. No. 6.150.584, que estão incorporados aqui por referência em sua totalidade). Anticorpos naturais são os anticorpos

produzidos por um animal hospedeiro depois de ser imunizado com um antígeno, tal como um polipeptídeo.

Ácidos nucleicos e sistemas de expressão

[0108] A presente descrição abrange moléculas de ácido nucleico que codificam genes da cadeia leve e pesada de imunoglobulina para anticorpos monoclonais anti-hPG, vetores que compreendem tais ácidos nucleicos e células hospedeiras capazes de produzir os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição.

[0109] Um anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição pode ser preparado pela expressão recombinante de genes da cadeia leve e pesada de imunoglobulina em uma célula hospedeira. Para expressar um anticorpo recombinantemente, uma célula hospedeira é transfectada com um ou mais vetores de expressão que carregam fragmentos de DNA que codificam as cadeias leve e pesada de imunoglobulina do anticorpo tal que as cadeias leve e pesada sejam expressas na célula hospedeira e, opcionalmente, secretadas no meio no qual as células hospedeiras são cultivadas, de cujo meio os anticorpos podem ser recuperados. Metodologias padronizadas de DNA recombinante são usadas para obter os genes da cadeia leve e pesada do anticorpo, incorporar esses genes nos vetores de expressão recombinantes e introduzir os vetores em células hospedeiras, tais como aquelas descritas em Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. *et al.*, eds., Greene Publishing Associates, 1989) e na Patente U.S. No. 4.816.397.

[0110] Para gerar os ácidos nucleicos que codificam tais anticorpos monoclonais anti-hPG, fragmentos de DNA que codificam as regiões variáveis de cadeia leve e pesada são inicialmente obtidos. Esses DNAs podem ser obtidos pela amplificação e modificação do DNA da linhagem germinativa ou cDNA que codifica as sequências variáveis de cadeia

leve e pesada, por exemplo, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Sequências de DNA da linhagem germinativa para os genes da região variável da cadeia leve e pesada são conhecidas na técnica (Veja, por exemplo, Lefranc *et al.*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77; Lefranc *et al.*, 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111; o banco de dados "VBASE" de sequência da linhagem germinativa humana; *veja também* Kabat, E. A. *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 22T:116-198; e Cox *et al.*, 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836; cujos conteúdos estão incorporados aqui por referência).

[0111] Uma vez que os fragmentos de DNA que codificam os segmentos de V_H e V_L relacionados com o anticorpo monoclonal anti-hPG, esses fragmentos de DNA podem ser manipulados posteriormente por técnicas de DNA recombinante padronizadas, por exemplo, para converter os genes da região variável em genes da cadeia do anticorpo de extensão completa, em genes de fragmento Fab e em um gene de scFv. Nessas manipulações, um fragmento de DNA que codifica V_H ou V_L está operativamente ligado a outro fragmento de DNA que codifica outra proteína, tal como uma região constante de anticorpo ou um ligante flexível. A expressão "operativamente ligada" como usada nesse contexto, é pretendida significar que os dois fragmentos de DNA estão ligados tal que as sequências de aminoácidos codificadas pelos dois fragmentos de DNA permanecem em fase.

[0112] O DNA isolado que codifica a região V_H pode ser convertido em um gene da cadeia pesada de extensão completa pela ligação operativa do DNA que codifica a V_H com outra molécula de DNA que codifica as regiões constantes da cadeia pesada (CH_1 , CH_2 , CH_3 e, opcionalmente CH_4). As sequências dos genes da região constante da

cadeia pesada humana são conhecidas na técnica (Veja, por exemplo, Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e os fragmentos de DNA que abrangem essas regiões podem ser obtidos pela amplificação com PCR padronizada. A região constante da cadeia pesada pode ser uma região constante de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgE, IgM ou IgD, mas em certas modalidades é uma região constante de IgG₁ ou IgG₄. Para um gene da cadeia pesada de fragmento Fab, o DNA que codifica V_H pode ser operativamente ligado a outra molécula de DNA que codifica apenas a região constante CH₁ da cadeia pesada.

[0113] O DNA isolado que codifica a região V_L pode ser convertido em um gene da cadeia leve de extensão completa (assim como um gene da cadeia leve de Fab) pela ligação operativa do DNA que codifica a V_L com outra molécula de DNA que codifica a região constante da cadeia leve, CL. As sequências dos genes da região constante da cadeia leve humana são conhecidas na técnica (Veja, por exemplo, Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) e os fragmentos de DNA que abrangem essas regiões podem ser obtidos pela amplificação com PCR padronizada. A região constante da cadeia leve pode ser uma região constante kappa ou lambda, mas em certas modalidades é uma região constante kappa. Para criar um gene scFv, os fragmentos de DNA que codificam V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um ligante flexível, por exemplo, que codifica a sequência de aminoácido (Gly₄~Ser)₃ (SEQ ID NO: 99), tal que as sequências de V_H e V_L podem ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua com as regiões V_H e V_L ligadas pelo ligante flexível. (Veja, por exemplo, Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426; Huston *et al.*, 1988,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554).

[0114] Para expressar os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição, os DNAs que codificam as cadeias leve e pesada parciais ou de extensão completa, obtidas como descrito acima, são inseridas em vetores de expressão tal que os genes são operativamente ligados a sequências de controle transcripcional e traducional. Nesse contexto, a expressão "operativamente ligada" é pretendida significar que um gene de anticorpo está ligado em um vetor tal que as sequências de controle transcripcional e traducional dentro do vetor servem a sua função pretendida de regular a transcrição e a tradução do gene de anticorpo. O vetor de expressão e as sequências de controle da expressão são escolhidas para serem compatíveis com a expressão na célula hospedeira usada. O gene da cadeia leve do anticorpo e o gene da cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vetores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão.

[0115] Os genes de anticorpo são inseridos no vetor de expressão por métodos padronizados (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares sobre o fragmento de gene do anticorpo e vetor ou ligação às cegas se os sítios de restrição não estão presentes). Antes da inserção das sequências de cadeia leve ou pesada relacionadas com o anticorpo monoclonal anti-hPG, o vetor de expressão já pode carregar as sequências da região constante do anticorpo. Por exemplo, uma abordagem para converter as sequências de V_H e V_L relacionadas com o anticorpo monoclonal anti-hPG em genes de anticorpo de extensão completa é inseri-las em vetores de expressão que já codifiquem as regiões constante da cadeia pesada e constante da cadeia leve, respectivamente, tal que o segmento de V_H esteja operativamente ligado ao(s) segmento(s) CH dentro do vetor e o segmento de V_L esteja

operativamente ligado ao segmento CL dentro do vetor. Adicionalmente ou alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode codificar um peptídeo de sinal que facilite a secreção da cadeia de anticorpo pela célula hospedeira. O gene da cadeia de anticorpo pode ser clonado no vetor, tal que o peptídeo de sinal está ligado em fase à terminação amino da cadeia do gene de anticorpo. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglobulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal de uma proteína não imunoglobulina).

[0116] Em adição aos genes da cadeia de anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da descrição carregam sequências regulatórias que controlam a expressão dos genes da cadeia do anticorpo em uma célula hospedeira. A expressão "sequência regulatória" é pretendida incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle da expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação) que controlem a transcrição ou a tradução dos genes da cadeia de anticorpo. Tais sequências regulatórias estão descritas, por exemplo, em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990). Será apreciado por aqueles versados na técnica que o desenho do vetor de expressão incluindo a seleção de sequências regulatórias pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada, etc. Sequências regulatórias adequadas para expressão em célula hospedeira de mamífero incluem elementos virais que direcionam altos níveis de expressão de proteína em células de mamíferos, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/intensificador de CMV), Vírus 40 de Síntio (SV40) (tal como o promotor/intensificador de SV40), adenovírus (por exemplo, o promotor precoce principal de adenovírus (AdMLP) e poliomídia. Para uma descrição posterior de elementos regulatórios virais e suas

sequências, veja, por exemplo, Patente U.S. No. 5.168.062 de Stinski, Patente U.S. No. 4.510.245 de Bell *et al.*, e Patente U.S. No. 4.968.615 de Schaffner *et al.*

[0117] Em adição aos genes da cadeia do anticorpo e as sequências regulatórias, os vetores de expressão recombinantes da descrição podem carregar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção das células hospedeiras nas quais o vetor tenha sido introduzido (Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4,399.216, 4,634.665 e 5.179.017, todas por Axel *et al.*). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a fármacos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, em uma célula hospedeira na qual o vetor tenha sido introduzido. Genes marcadores selecionáveis adequados incluem a gene de di-hidrofolato redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras DHFR⁻ com seleção/amplificação com metotrexato) e o gene neo (para seleção com G418). Para a expressão das cadeias leve e pesada, os vetores de expressão que codificam as cadeias pesada e leve são transfetados em uma célula hospedeira por técnicas padronizadas. As várias formas da expressão "transfecção" são pretendidas abranger uma grande variedade de técnicas comumente usadas para a introdução de DNA exógeno em uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica, por exemplo, eletroporação, lipofecção, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção com DEAE-dextran e semelhantes.

[0118] É possível expressar os anticorpos da descrição em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas. Em certas modalidades, a expressão dos anticorpos é realizada em células eucarióticas, por exemplo, células hospedeiras de mamífero de secreção ótima de um anticorpo apropriadamente enovelado e imunologicamente ativo.

Células hospedeiras de mamífero exemplificadoras para a expressão dos anticorpos recombinantes da descrição incluem células de Ovário de Hamster Chinês (células CHO) (que incluem células CHO DHFR⁻, descritas em Urlaub and Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas com um marcador selecionável de DHFR, por exemplo, como descrito em Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), células NOS de mieloma, células COS e células SP2. Quando os vetores de expressão recombinantes que codificam os genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos pela cultura das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou a secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando métodos de purificação de proteína padronizados. As células hospedeiras também podem ser usadas para produzir porções de anticorpos intactos, tais como fragmentos Fab ou moléculas scFv. Entende-se que as variações do procedimento acima estão dentro do escopo da presente descrição. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com um DNA que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada (mas não ambas) de um anticorpo monoclonal anti-hPG dessa descrição.

[0119] A tecnologia de DNA recombinante também pode ser usada para remover algum ou todo o DNA que codifica qualquer uma ou ambas cadeias leve e pesada que não são necessárias para a ligação a hPG. As moléculas expressas a partir de tais moléculas truncadas de DNA também são abrangidas pelos anticorpos da descrição.

[0120] Para a expressão recombinante de um anticorpo monoclonal anti-hPg da descrição, a célula hospedeira pode ser co-transfetada com dois vetores de expressão da descrição, o primeiro vetor

codificando um polipeptídeo derivado da cadeia pesada e o segundo vetor codificando um polipeptídeo derivado da cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores selecionáveis idênticos ou eles podem conter cada um marcador selecionável separado. Alternativamente, um único vetor pode ser usado codificando ambos os polipeptídeos da cadeia pesada e leve.

[0121] Uma vez que o ácido nucleico codifique uma ou mais porções de um anticorpo monoclonal anti-hPG, alterações posteriores ou mutações podem ser introduzidas na sequência codificadora, por exemplo, para gerar ácidos nucleicos que codifiquem anticorpos com sequências de CDR diferentes, anticorpos com afinidade reduzida pelo receptor Fc ou anticorpos de diferentes subclasses.

[0122] Os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição também podem ser produzidos pela síntese química (por exemplo, pelos métodos descritos em Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.). Variantes de anticorpo também podem ser geradas usando uma plataforma sem célula (Veja, por exemplo, Chu *et al.*, Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals).

[0123] Uma vez que o anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição tenha sido produzido pela expressão recombinante, ele pode ser purificado por qualquer método conhecido na técnica para a purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, pela cromatografia (por exemplo, cromatografia de coluna por troca de íon, afinidade e por tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica padronizada para a purificação de proteínas. Adicionalmente, os anticorpos monoclonais anti-hPG da presente descrição ou seus fragmentos podem ser fundidos a sequências de polipeptídeos heterólogos aqui descritas ou conhecidas de outra maneira na técnica para facilitar a purificação.

[0124] Uma vez isolado, o anticorpo monoclonal anti-hPG pode, se desejado, ser purificado, por exemplo, pela cromatografia líquida de alto desempenho (Veja, por exemplo, Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980), ou pela cromatografia por filtração em gel em uma coluna SuperdexTM 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia).

[0125] A presente descrição fornece células hospedeiras capazes de produzir anticorpos monoclonais anti-hPG. As células hospedeiras podem ser manipuladas usando técnicas de DNA recombinante para expressar genes que codificam a cadeia leve e pesada ou hibridomas derivados de um organismo adequado e selecionadas quanto a habilidade de produzir os anticorpos desejados.

[0126] As células hospedeiras capazes de produzir anticorpos monoclonais anti-PG podem ser hibridomas. Métodos para a geração de hibridomas são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495) e um exemplo é fornecido abaixo. Geralmente, um hospedeiro animal, tal como um camundongo é imunizado com um imunógeno, tal como um peptídeo de interesse, para desencadear o desenvolvimento de linfócitos, por exemplo, células do baço, que produzem anticorpos capazes de se ligar especificamente ao imunógeno. Alternativamente, linfócitos isolados, incluindo células do baço, células de linfonodos ou linfócitos do sangue periférico, podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são fundidos com uma linhagem celular imortalizada, tal como uma linhagem celular de mieloma, usando um agente de fusão adequado (por exemplo, polietileno glicol), para formar uma linhagem celular de hibridoma. Linhagens celulares imortalizadas adequadas podem ser de origem de mamífero, tal como de murino, bovino ou humano. As células do hibridoma são cultivadas depois em qualquer meio adequado que contenha uma ou mais substâncias que iniba, o crescimento ou a sobrevida das células não fundidas,

imortalizadas. Por exemplo, quando as células parentais que carecem da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT) são usadas, as fusões podem ser cultivadas em meio que contenha hipoxantina, aminopterina e timidina (meio "HAT"), que inibe o crescimento de células parentais, não fundidas.

[0127] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminais possuem CDRs de uma cadeia leve variável (V_L) que correspondem a V_L do anticorpo monoclonal obtido dos hibridomas 43B9G11 (que produz MAb 1 anti-hPG), WE5H2G7 (que produz MAb 2 anti-hPG), 6B5B11C10 (que produz MAb 3 anti-hPG), 20D2C3G2 (que produz MAb 4 anti-hPG), 1E9A4A4 (que produz MAb 15 anti-hPG), 1E9D9B6 (que produz MAb 16 anti-hPG), 1C8D10F5 (que produz MAb 17 anti-hPG), 1A7C3F11 (que produz MAb 18 anti-hPG), 1B3B4F11 (que produz MAb 19 anti-hPG), e 1C11F5E8 (que produz MAb 20 anti-hPG).

[0128] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG N-terminais possuem CDRs de V_L e V_H que correspondem a CDRs de V_L e V_H dos anticorpos monoclonais obtidos dos hibridomas acima.

[0129] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-hPG C-terminais possuem CDRs de uma cadeia leve variável (V_L) que correspondem a V_L do anticorpo monoclonal obtido dos hibridomas 1B4A11D11 (que produz MAb 5 anti-hPG), 1B6A11F2 (que produz MAb 6 anti-hPG), 1B11E4B11 (que produz MAb 7 anti-hPG), 1C10D3B9 (que produz MAb 8 anti-hPG), 1D8F5B3 (que produz MAb 9 anti-hPG), 1E1C7B4 (que produz MAb 10 anti-hPG), 2B4C8C8 (que produz MAb 11 anti-hPG), 2B11E6G4 (que produz MAb 12 anti-hPG), 2C6C3C7 (que produz MAb 13 anti-hPG), 2H9F4B7 (que produz MAb 14 anti-hPG), 1F11F5E10 (que produz MAb 21 anti-hPG), 1F11F5G9 (que produz MAb 22 anti-hPG), e 1A11F2C9 (que produz MAb 23 anti-hPG).

[0130] Em algumas modalidades, os anticorpos monoclonais anti-

hPG C-terminais possuem CDRs de VL e VH que correspondem a CDRs de VL e VH dos anticorpos monoclonais obteníveis dos hibridomas acima.

[0131] Em uma modalidade, uma célula hospedeira capaz de produzir um anticorpo anti-hPG que compreenda uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 12 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 13 é fornecida. Em uma modalidade, uma célula hospedeira capaz de produzir um anticorpo anti-hPG que compreenda uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 14 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 15 é fornecida. Em uma modalidade, uma célula hospedeira capaz de produzir um anticorpo anti-hPG que compreenda uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 59 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 63 é fornecida. Em uma modalidade, uma célula hospedeira capaz de produzir um anticorpo anti-hPG que compreenda uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 60 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 64 é fornecida. Em uma modalidade, uma célula hospedeira capaz de produzir um anticorpo anti-hPG que compreenda uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 61 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 65 é fornecida. Em uma modalidade, uma célula hospedeira capaz de produzir um anticorpo anti-hPG que compreenda uma região variável de cadeia pesada que compreende a SEQ ID NO: 62 e uma região variável de cadeia leve que compreende a SEQ ID NO: 66 é fornecida.

[0132] Em algumas modalidades, uma célula hospedeira da descrição compreende um ácido nucleico selecionado dentre: uma sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo da região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 12, 14, 59, 60, 61 e 62; e um ácido

nucleico selecionado dentre: uma sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo da região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 13, 15, 63, 64, 65 e 66. Em algumas modalidades, região variável de cadeia pesada é codificada por uma sequência de ácido nucleico selecionada dentre: SEQ ID NO: 16, 18, 67, 68, 69 e 70. Em algumas modalidades, região variável de cadeia leve é codificada por uma sequência de ácido nucleico selecionada dentre: SEQ ID NO: 17, 19, 71, 72, 73 e 74.

[0133] Em algumas modalidades, são fornecidas sequências de polinucleotídeo que codificam uma região variável de cadeia pesada de um anticorpo monoclonal anti-hPG humanizado. Modalidades específicas incluem polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 21, 23, 75, 77, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, e 94. Em algumas modalidades, são fornecidas sequências de polinucleotídeo que codificam uma região variável de cadeia leve de um anticorpo monoclonal anti-hPG humanizado. Modalidades específicas incluem polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 22, 24, 76, 78, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, e 95.

Atividades biológicas de anticorpos monoclonais anti-hPG

[0134] PG tem sido implicada na sobrevida e/ou proliferação da célula de tumor de CRC. Embora não pretendendo estar ligado a qualquer teoria de operação, através da ligação de PG, anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes são considerados bloquear ou inibir a habilidade de PG de interagir com seus parceiros de sinalização. Isso, por sua vez, bloqueia ou inibe as respostas celulares à progastrina, tais como a proliferação celular, diferenciação celular reduzida e/ou morte celular reduzida e/ou crescimento do tumor. Como consequência dessas atividades, os anticorpos monoclonais anti-hPG neutralizantes da descrição podem ser usados em uma variedade de contextos *in vitro*,

in vivo e *ex vivo* para se ligar a PG e bloquear a sinalização dependente de PG.

[0135] Consequentemente, a descrição fornece métodos para inibir as respostas dependentes de PG em células de CRC. De modo geral, o método compreende contatar uma célula de CRC ou expor uma população celular a um anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante em uma quantidade eficaz para inibir uma ou mais respostas induzidas por PG de células CRC, por exemplo, a proliferação e/ou sobrevida de células de CRC. A proliferação ou sua inibição *in vitro* e *in vivo* pode ser determinada de acordo com ensaios para medir aumentos no número de células, número de tumores ou tamanho do tumor ao longo do tempo. Ensaios para a inibição da proliferação de células e tumores são bem conhecidos na técnica.

[0136] O bloqueio da sinalização dependente de PG pode inibir a sobrevida de células de CRC pelo aumento da morte celular. A inibição da sobrevida de célula de CRC *in vitro* ou *in vivo* pode ser determinada pela medição da redução do número de células de câncer vivas durante um período (por exemplo, 24 ou 48 horas). Ensaios para morte celular são bem conhecidos na técnica. Adicionalmente, um exemplo de um ensaio de sobrevivência celular é fornecido aqui.

[0137] Estudos posteriores sugerem que a inibição da sinalização dependente de PG em células de tumor de CRC pode inibir a sobrevida das células de CRC pelo desencadeamento da morte celular programada ou apoptose. A indução da apoptose pode ser determinada por qualquer meio conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a medir alterações na expressão de genes que possuem atividade pro ou anti-apoptótica. Por exemplo um aumento na expressão na expressão ao longo do tempo (por exemplo, 48 horas) de um gene pro-apoptótico, tal como, por exemplo, Bax, é indicativo de um aumento na apoptose. Similarmente, uma diminuição na expressão ao longo do tempo (por

exemplo, 72 ou 96 horas) de um gene anti-apoptótico tal como, por exemplo, mas não limitado a Bcl-2, é indicativa de um aumento na apoptose. Técnicas para medir as alterações na expressão de gene, tal como PCR quantitativa em tempo real, são bem conhecidas. Veja, por exemplo, Hollande *et al.*, WO 2007/135542.

[0138] A inibição da sinalização dependente da progastrina também estimula a diferenciação celular. Consequentemente, os métodos de inibição da proliferação e/ou da sobrevida de células de CRC compreende administrar uma quantidade de um anticorpo monoclonal anti-PG neutralizante eficaz para induzir a diferenciação de células de CRC *in vitro* ou *in vivo*. A diferenciação de células de CRC pode ser determinada pela medição de aumentos ao longo do tempo (por exemplo, 24 ou 48 horas) na expressão de marcadores genéticos para a diferenciação celular tal como, por exemplo, mas não limitados a Muc-2 ou outros marcadores para células intestinais diferenciadas (por exemplo, células caliciformes). As alterações na expressão de gene podem ser medidas por qualquer meio conhecido na técnica. Veja, por exemplo, Hollande *et al.*, WO 2007/135542. Outros genes cuja expressão ou repressão é dependente de PG, tal como ICAT, também podem ser ensaiados usando métodos padronizados. Veja, *id.*

Composições farmacêuticas

[0139] Anticorpos monoclonais anti-PG podem ser formulados em composições. Opcionalmente, as composições podem compreender um ou mais agentes terapêuticos adicionais, tais como os agentes terapêuticos secundários descritos abaixo e são fornecidos aqui. As composições serão geralmente fornecidas como parte de uma composição farmacêutica, estéril que incluirá normalmente um veículo farmaceuticamente aceitável. Essa composição pode estar em qualquer forma adequada (dependendo do método de administração desejado para um paciente)

[0140] Os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição podem ser administrados a um paciente por uma variedade de vias tais como as vias oral, transdérmica, subcutânea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intra-ocular, topicamente, intratecal e intracerebroventricular. A via mais adequada para a administração em qualquer caso dado dependerá do anticorpo em particular, do indivíduo e da natureza e severidade da doença e da condição física do indivíduo. O anticorpo pode ser formulado como uma solução aquosa e administrado por injeção subcutânea.

[0141] As composições farmacêuticas podem ser convenientemente apresentadas em formas de dosagem unitária contendo uma quantidade predeterminada de um anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição por dose. Tal unidade pode conter, por exemplo, sem limitação 5 mg a 5 g, por exemplo, 10 mg a 1 g ou 20 a 50 mg. Veículos farmaceuticamente aceitáveis para uso na descrição podem assumir uma variedade de formas dependendo, por exemplo, da condição a ser tratada ou da via de administração.

[0142] As composições farmacêuticas da descrição podem ser preparadas para armazenamento como formulações liofilizadas ou soluções aquosas pela mistura do anticorpo que tenha o grau de pureza desejado com veículos, excipientes ou estabilizadores farmaceuticamente aceitáveis opcionais tipicamente empregados na técnica (todos os quais são referidos aqui como "veículos"), isto é, agentes para tamponamento, agentes para estabilização, conservantes, isotonificantes, detergentes não iônicos, antioxidantes e outros aditivos diversos. Veja, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980). Tais aditivos não devem ser tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas.

[0143] Agentes de tamponamento auxiliam a manter o pH na faixa que se aproxima das condições fisiológicas. Eles podem estar presentes

em uma concentração que varia entre cerca de 2 mM a cerca de 50 mM. Agentes de tamponamento adequados para uso com a presente descrição incluem ácidos orgânicos e inorgânicos e seus sais tais como tampões de citrato (por exemplo, mistura de citrato monossódico- citrato dissódico, mistura de ácido cítrico-citrato trissódico, mistura de ácido cítrico-citrato monossódico, etc.), tampões de succinato (por exemplo, mistura de ácido succínico-succinato monossódico, mistura de ácido succínico-hidróxido de sódio, mistura de ácido succínico-succinato dissódico, etc.), tampões de tartarato (por exemplo, mistura de ácido tartárico-tartarato de sódio, mistura de ácido tartárico-tartarato de potássio, mistura de ácido tartárico-hidróxido de sódio, etc.), tampões de fumarato (por exemplo, mistura de ácido fumárico-fumarato monossódico, de ácido fumárico-fumarato dissódico, mistura de fumarato monossódico- fumarato dissódico, etc.), tampões de gliconato (por exemplo, mistura de ácido glicônico-gliconato de sódio, mistura de ácido glicônico-hidróxido de sódio, mistura de ácido glicônico-gliconato de potássio, etc.), tampão oxalato (por exemplo, mistura de ácido oxálico-oxalato de sódio, mistura de ácido oxálico-hidróxido de sódio, mistura de ácido oxálico-oxalato de potássio, etc.), tampões de lactato (por exemplo, mistura de ácido láctico-lactato de sódio, mistura de ácido láctico-hidróxido de sódio, mistura de ácido láctico-lactato de potássio, etc.) e tampões de acetato (por exemplo, mistura de ácido acético-acetato de sódio, mistura de ácido acético-hidróxido de sódio, etc.). Adicionalmente, podem ser usados tampões fosfato, tampões de histidina e sais de trimetilamina tal como Tris.

[0144] Conservantes também podem ser adicionados para retardar o crescimento microbiano e podem ser adicionados em quantidades que variam entre 0,2% a 1% (peso/volume). Conservantes adequados para uso com a presente descrição incluem fenol, álcool benzílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno,

cloreto de octadecildimetilbenzil amônia, haletos de benzalcônio (por exemplo, cloreto, brometo e iodeto), cloreto de hexametonio, e alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, e 3-pentanol. Isotonificantes, algumas vezes conhecidos como "estabilizantes" podem ser adicionados para assegurar a isotonicidade das composições líquidas da presente descrição e incluem polialcoóis poli-hídricos, por exemplo, polialcoois tri-hídricos ou superiores, tais como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol. Os estabilizantes referem-se a uma grande categoria de excipientes que variam em função entre um agente espessante a um aditivo que solubiliza o agente terapêutico ou auxilia a prevenir a desnaturação ou a aderência com a parede do recipiente. Estabilizantes típicos podem ser alcoóis poli-hídricos (enumerados acima); aminoácidos tais como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, *etc.*, açúcares orgânicos ou polióis, tais como lactose, trealose, estaquiose, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol e semelhantes, incluindo ciclitois tal como inositol; polietileno glicol; polímeros de aminoácidos; agentes redutores contendo enxofre, tais como ureia, glutationa, ácido tiocálico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, α -monotioglicerol e tio sulfato de sódio; polipeptídeos de baixo peso molecular (por exemplo, peptídeos com 10 resíduos ou menos); proteínas tais como albumina sérica humana, albumina sérica bovina, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona, monossacarídeos tais como xilose, manose, frutose, glicose; dissacarídeos tais como lactose, maltose, sacarose e trissacarídeos tais como rafinose; e polissacarídeos tais como dextran. Os estabilizadores podem estar presentes na faixa entre 0,1 a 10.000 partes em peso do peso da proteína ativa.

[0145] Tensoativos não iônicos ou detergentes (também conhecidos como "agentes umectantes") podem ser adicionados para ajudar a solubilizar o agente terapêutico assim como proteger a proteína terapêutica contra a agregação induzida pela agitação, o que também permite que a formulação seja exposta ao cisalhamento da superfície saliente sem causar a desnaturação da proteína. Tensoativos não iônicos adequados incluem polisorbatos (20, 80, etc.), polioxâmberos (184, 188, etc.), Pluronic, polióis, monoéteres de polioxietileno sorbitano (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Tensoativos não iônicos podem estar presentes em uma faixa entre cerca de 0,05 mg/mL a cerca de 1,0 mg/mL, por exemplo cerca de 0,07 mg/mL a cerca de 0,2 mg/mL.

[0146] Excipientes diversos adicionais incluem agentes de volume (por exemplo, amido), agentes quelantes (por exemplo, EDTA), antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) e co-solventes.

[0147] Os anticorpos monoclonais anti-PG podem ser administrados isoladamente, como misturas de um ou mais anticorpos monoclonais anti-PG, em mistura ou combinação com outros agentes úteis para tratar CRC ou adjuntos para outra terapia para CRC. Exemplos de combinação adequada e terapias adjuntas são fornecidos abaixo.

[0148] São abrangidos pela presente descrição kits farmacêuticos que contêm anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes (incluindo conjugados de anticorpo) da descrição. O kit farmacêutico é uma embalagem que compreende um anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante (por exemplo, em forma liofilizada ou como uma solução aquosa) e um ou mais dos seguintes:

- Um segundo agente terapêutico, por exemplo, como descrito abaixo;
- Um dispositivo para administrar o anticorpo monoclonal

anti-hPG, por exemplo, uma caneta, agulha e/ou seringa; e

- Água de grau farmacêutico ou tampão para ressuspender o anticorpo, se o anticorpo estiver em forma liofilizada.

[0149] Cada dose unitária do anticorpo monoclonal anti-hPG pode ser embalada separadamente e um kit pode conter uma ou mais doses unitárias (por exemplo, duas doses unitárias, três doses unitárias, quatro doses unitárias, cinco doses unitárias, oito doses unitárias, dez doses unitárias ou mais). Em uma modalidade específica, uma ou mais doses unitárias são, cada uma, abrigadas em uma seringa ou caneta.

Dosagens eficazes

[0150] Os anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes ou suas composições serão usados geralmente em uma quantidade eficaz para obter o resultado pretendido, por exemplo, uma quantidade eficaz para tratar CRC em um indivíduo necessitado. As composições farmacêuticas que compreendem anticorpos monoclonais anti-PG neutralizantes podem ser administradas a pacientes (por exemplo, indivíduos humanos) em dosagens terapeuticamente eficazes. Como usada aqui, uma dosagem "terapeuticamente eficaz" é uma quantidade que confere benefício terapêutico. No contexto da terapia de CRC, um benefício terapêutico significa qualquer melhora de CRC, incluindo qualquer um de, ou combinação de paralisar ou retardar a progressão de CRC (por exemplo, de um estágio de câncer colorretal para o próximo), paralisando ou retardando o agravamento ou a deterioração dos sintomas ou sinais de CRC, reduzindo a severidade de CRC, induzindo a remissão de CRC, inibindo a proliferação de célula de tumor de CRC, o tamanho do tumor de CRC ou o número de tumores de CRC ou reduzindo os níveis séricos de PG.

[0151] A quantidade de anticorpo monoclonal anti-PG neutralizante administrada dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a natureza e o estágio da CRC a ser tratado, a forma, a via e o sítio de administração,

o regime terapêutico (por exemplo, se um segundo agente terapêutico for usado), a idade e a condição do indivíduo a ser tratado em particular, da sensibilidade do paciente a ser tratado aos anticorpos monoclonais anti-PG. A dosagem apropriada pode ser determinada prontamente pela pessoa versada na técnica. Em última análise, um médico determinará as dosagens apropriadas a serem usadas. Essa dosagem pode ser repetida tão frequentemente quanto apropriado. Se efeitos colaterais surgirem, a quantidade e a frequência da dosagem podem ser alteradas ou reduzidas, de acordo com a prática clínica normal. A dosagem apropriada e o regime de tratamento podem ser estabelecidos pela monitoração do progresso da terapia usando as técnicas convencionais conhecidas pelas pessoas versadas na técnica.

[0152] As dosagens eficazes podem ser avaliadas inicialmente a partir de ensaios *in vitro*. Por exemplo, uma dose inicial para uso em animais pode ser formulada para obter uma concentração no sangue circulante ou no soro do anticorpo monoclonal anti-PG que esteja na afinidade de ligação ou acima dela, do anticorpo para a progastrina como medida *in vitro*. As doses calculadas para obter tais concentrações no sangue circulante ou no soro levando em consideração a biodisponibilidade do anticorpo em particular está dentro da capacidade dos técnicos qualificados. Para orientações, o leitor é remetido a Fingl & Woodbury, "General Principles" in *Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, Capítulo 1, última edição, Pagamonon Press e as referências citadas nesse.

[0153] As dosagens iniciais podem ser avaliadas a partir de dados *in vivo*, tais como modelos animais. Modelos animais úteis para testar a eficácia de compostos para tratar CRC são bem conhecidos na técnica. Adicionalmente, os modelos animais de CRC estão descritos nos Exemplos abaixo. Os técnicos experientes podem adaptar rotineiramente tal informação para determinar dosagens adequadas para a

administração humana.

[0154] A dose eficaz de um anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante da descrição pode variar entre cerca de 0,001 a cerca de 75 mg/kg por administração única (por exemplo, em bolo), administrações múltiplas ou administração contínua ou para obter uma concentração sérica de 0,01 a 5000 µg/mL por administração única (por exemplo, em bolo), administrações múltiplas ou administração contínua ou qualquer faixa ou valor eficazes dependendo da condição a ser tratada, da via de administração e da idade, peso e condição do indivíduo. Em uma certa modalidade, cada dose pode variar entre cerca de 0,5 µg a cerca de 50 µg por quilograma de peso corporal, por exemplo, entre cerca de 3 µg a cerca de 30 µg por quilograma de peso corporal.

[0155] A quantidade, a frequência e a duração da administração dependerão de uma variedade de fatores, tais como a idade, peso e a condição da doença. Um regime terapêutico para administração pode continuar por 2 semanas a indefinidamente, por 2 semanas a 6 meses, entre 3 meses a 5 anos, entre 6 meses a 1 ou 2 anos, entre 8 meses a 18 meses ou semelhantes. Opcionalmente, o regime terapêutico provê a administração repetida, por exemplo, uma vez por dia, duas vezes por dia, a cada dois dias, três dias, cinco dias, uma semana, duas semanas ou um mês. A administração repetida pode ser na mesma dose ou em uma dose diferente. A administração pode ser repetida uma vez, duas vezes, três vezes, quatro vezes, cinco vezes, seis vezes, sete vezes, oito vezes, nove vezes, dez vezes ou mais. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal anti-hPG pode ser administrada como uma dose única ou ao longo do decorrer de um regime terapêutico, por exemplo, ao longo de uma semana, duas semanas, três semanas, um mês, três meses, seis meses, um ano ou mais.

Métodos terapêuticos

[0156] A habilidade de anticorpos monoclonais anti-hPG neutralizantes da presente descrição de bloquear respostas dependentes de PG, incluindo a proliferação celular, torna-os úteis para tratar o câncer colorretal. Consequentemente, em outro aspecto, a presente descrição fornece métodos de tratamento de CRC em um paciente necessitado. Geralmente, os métodos compreendem administrar ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante da descrição.

[0157] Um "indivíduo" ou "paciente" no qual o anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição é administrado, é preferivelmente um mamífero tal como um não primata (por exemplo, vaca, porco, cavalo, gato, cachorro, rato, etc.) ou um primata (por exemplo, macaco ou humano). O indivíduo ou paciente pode ser um humano, tal como um paciente adulto ou um paciente pediátrico.

[0158] Pacientes adequados para a terapia com o anticorpo monoclonal anti-hPG são pacientes diagnosticados com CRC. O CRC pode ser de qualquer tipo e em qualquer estágio clínico ou manifestação. Indivíduos adequados incluem pacientes com tumores de CRC (operáveis ou inoperáveis), pacientes cujos tumores tenham sido cirurgicamente removidos ou ressecados, pacientes com um tumor de CRC que compreenda células que carregam uma mutação em um oncogene, tal como, por exemplo, RAS ou APC, pacientes que tenham recebido ou que recebem outra terapia para CRC em combinação ou secundária a terapia com anticorpo monoclonal anti-hPG. Outra terapia para CRC inclui, mas não está limitada ao tratamento quimioterápico, terapia com radiação, ressecção cirúrgica e tratamento com um ou mais outros anticorpos terapêuticos, como detalhado abaixo.

[0159] A terapia com anticorpo monoclonal anti-hPG pode ser combinada, ou secundária a um ou mais outros tratamentos. Outros tratamentos incluem, sem limitação, tratamento quimioterapêutico,

terapia com radiação, ressecção cirúrgica e terapia com anticorpo, como aqui descrito.

[0160] A terapia com terapia com anticorpo monoclonal anti-hPG pode ser secundária a outro tratamento, incluindo a ressecção cirúrgica.

[0161] A terapia de combinação como fornecida aqui envolve a administração de pelo menos dois agentes a um paciente, o primeiro dos quais é um anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante da descrição e o segundo é um segundo agente terapêutico. O anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante e o segundo agente terapêutico podem ser administrados simultaneamente, sucessivamente ou separadamente.

[0162] Como usado aqui, o anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante e o segundo agente terapêutico são ditos ser administrados sucessivamente, se eles forem administrados ao paciente no mesmo dia, por exemplo, durante a mesma visita ao paciente. A administração sucessiva pode ocorrer com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ou 8 horas de diferença. Ao contrário, o anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição e o segundo agente terapêutico são ditos serem administrados separadamente se eles forem administrados ao paciente em dias diferentes, por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição e o segundo agente terapêutico podem ser administrados em intervalos de 1 dia, 2 dias ou 3 dias, uma semana, 2 semanas ou mensalmente. Nos métodos da presente descrição, a administração do anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição pode preceder ou seguir a administração do segundo agente terapêutico.

[0163] Como um exemplo não limitante, o anticorpo monoclonal anti-hPG neutralizante e o segundo agente terapêutico podem ser administrados por um período de tempo, seguido por um seguido período de tempo no qual a administração do anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição e o segundo agente terapêutico é alternada.

[0164] As terapias de combinação da presente descrição podem resultar em um efeito mais do que aditivo ou sinérgico, fornecendo benefícios terapêuticos onde nem o anticorpo monoclonal anti-hPG nem o segundo agente terapêutico são administrados em uma quantidade que, sozinha, é terapeuticamente eficaz. Portanto, tais agentes podem ser administrados em quantidades menores, reduzindo a possibilidade e/ou a severidade de efeitos adversos.

[0165] Um segundo agente terapêutico pode ser um agente quimioterapêutico. Agentes quimioterapêuticos incluem, mas não são limitados a moléculas radioativas, toxinas, também referidos como citotoxinas ou agentes citotóxicos, que incluem qualquer agente que é prejudicial para a viabilidade das células, agentes e lipossomas ou outras vesículas que contenham compostos quimioterapêuticos. Exemplos de agentes quimioterapêuticos adequados incluem, mas não são limitados a 1-dehidrotestosterona, 5-fluorouracil decarbazina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, actinomicina D, adriamicina, aldesleuquina, agentes alquilantes, alopurinol sódico, altretamina, amifostina, anastrozol, antramicina (AMC)), agentes anti-mitóticos, cis-diclorodiamina platina (II) (DDP cisplatina), diamino dicloro platina, antraciclinas, antibióticos, antimetabolitos, asparaginase, BCG vivo (intravesical), fosfato sódico de betametasona e acetato de betametasona, bicalutamida, sulfato de bleomicina, busulfan, leucouorin cálcico, caliqueamicina, capecitabina, carboplatina, lomustina (CCNU), carmustina (BSNU), Clorambucil, Cisplatina, Cladribina, Colchicina, estrogênios conjugados, Ciclofosfamida, Ciclotosfamida, Citarabina, Citarabina, citocalasina B, Cytoxan, Dacarbazina, Dactinomicina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunirubicina HCL, citrato de daunorubicina, denileuquina diftitox, Dexrazoxane, Dibromomannitol, dihidroxi antracin diona, Docetaxel, mesilato de dolasetron, doxorubicina HCL, dronabinol, L-asparaginase de *E. coli*, emetina,

epoetina- α , L-asparaginase de *Erwinia*, estrogênios esterificados, estradiol, fosfato sódico de estramustina, brometo de etídio, etinil estradiol, etidronato, fator citrovorum de etoposídeo, fosfato de etoposídeo, filgrastim, floxuridina, fluconazol, fosfato de fludarabina, fluorouracil, flutamida, ácido folínico, gemcitabina HCL, glicocorticoides, acetato de goserelina, gramicidina D, granisetron HCL, hidroxiureia, idarubicina HCL, ifosfamida, interferon α -2b, irinotecan HCL, letrozol, leucovorin calcico, acetato de leuprolide, levamisol HCL, lidocaina, lomustina, maitansinoide, mecloretamina HCL, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melfalan HCL, mercaptipurina, mesna, metotrexate, metiltestosterona, mitramicina, mitomicina C, mitotane, mitoxantrona, nilutamida, acetato de octreotide, ondansetron HCL, oxaliplatina, paclitaxel, pamidronato disodico, pentostatina, pilocarpina HCL, plimicina, polifeprosan 20 com implante de carmustina, porfimer sodico, procaína, procarbazina HCL, propranolol, rituximab, sargramostim, estreptozotocina, tamoxifen, taxol, tegafur, teniposideo, tenoposideo, testolactona, tetracaina, tioepa clorambucil, tioguanina, tiotepa, topotecan HCL, citrato de toremifeno, trastuzumab, tretinoína, valrubicina, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, e tartarato de vinorelbina.

[0166] Os anticorpos monoclonais anti-hPG neutralizantes aqui descritos podem ser administrados a um paciente que necessite de tratamento para o câncer colorretal que receba uma combinação de agentes quimioterapêuticos. Combinações exemplificadoras de agentes quimioterapêuticos incluem 5-fluorouracil (5FU) em combinação com leucovorin (ácido folínico ou LV); capecitabina, em combinação com uracil (UFT) e leucovorin; tegafur em combinação com uracil (UFT) e leucovorin; oxaliplatina em combinação com 5FU, ou em combinação com capecitabina; irinotecan em combinação com capecitabina, mitomicina C em combinação com 5FU, irinotecan ou capecitabina. O

uso de outras combinações de agentes quimioterapêuticos descritos aqui também é possível.

[0167] Como é conhecido na técnica relevante, os regimes quimioterapêuticos para o câncer colorretal usando as combinações de diferentes agentes quimioterapêuticos têm sido padronizados em testes clínicos. Tais regimes são geralmente conhecidos pelos acrônimos e incluem 5FU Mayo, 5FU Roswell Park, LVFU2, FOLFOX, FOLFOX4, FOLFOX6, bFOL, FUFOX, FOLFIRI, IFL, XELOX, CAPOX, XELIRI, CAPIRI, FOLFOXIRI. Veja, por exemplo, Chau, I., *et al.*, 2009, Br. J. Cancer 100:1704-19 and Field, K., *et al.*, 2007, World J. Gastroenterol. 13:3806-15, ambos incorporados por referência.

[0168] Os anticorpos monoclonais anti-hPG neutralizantes também podem ser combinados com outros anticorpos terapêuticos. Consequentemente, a terapia com o anticorpo monoclonal anti-hPG pode ser combinada ou administrada secundariamente a um anticorpo monoclonal diferente tal como, por exemplo, mas não limitado a um anticorpo monoclonal anti-EGFR (receptor de EGF) ou um anticorpo monoclonal anti-VEGF. Exemplos específicos de anticorpos anti-EGFR incluem cetuximab e panitumumab. Um exemplo específico de um anticorpo anti-VEGF é bevacizumab.

Detecção de progastrina usando anticorpos anti-hPG

[0169] Anticorpos monoclonais anti-PG, neutralizantes ou não neutralizantes, também são úteis para aplicações que dependem da detecção de PG tal como diagnosticar CRC ou monitorar os efeitos do tratamento de CRC em um indivíduo. Consequentemente, em um aspecto, a presente descrição fornece um método para diagnosticar o câncer colorretal em um paciente, compreendendo determinar a quantidade de progastrina em uma amostra de um paciente usando um anticorpo monoclonal anti-hPG de acordo com a presente descrição. Geralmente, os métodos para diagnosticar o câncer colorretal em um

paciente compreende medira a progastrina em uma amostra obtida de um paciente usando os anticorpos monoclonais anti-hPG da descrição, em que uma medida de 20 pM a 400 pM de progastrina em uma amostra é indicativa de câncer colorretal. A progastrina pode ser medida em amostras, por exemplo, de sangue, soro, plasma, tecido e/ou células. A detecção de hPG pode ser realizada usando ensaios conhecidos na técnica e/ou descritos aqui tais como ELISA, ELISA sanduíche, immunoblotting (Western blotting), imunoprecipitação, tecnologia BIACORE e semelhantes.

[0170] Como observado aqui, a progastrina é um de vários polipeptídeos que resultam do processamento pós-traducional do produto de gene da gastrina. Métodos de diagnóstico, monitoração e outros aqui descritos detectam especificamente hPG ao contrário de outros produtos de gene de gastrina, incluindo produtos de degradação. Consequentemente, em modalidades específicas, hPG é detectada usando um ELISA como descrito aqui, em que dois anticorpos para hPG são usados, atingindo as terminações N e C de hPG respectivamente. Em algumas modalidades, um dos dois anticorpos usados para a detecção é um anticorpo monoclonal anti-hPG como aqui descrito. Os níveis de hPG que variam entre 20 pM a 400 pM são indicativos de câncer colorretal.

[0171] Em geral, o procedimento para determinar os níveis de hPG usando os anticorpos monoclonais anti-hPG é o seguinte. Uma superfície, tal como poços em uma placa de 96 poços, é preparada, na qual uma quantidade conhecida de um primeiro anticorpo, "de captura", ao qual hPG é ligado. O anticorpo de captura pode ser, por exemplo, um anticorpo anti-hPG que se ligue a terminação C ou N de hPG. Depois do bloqueio, uma amostra de teste é aplicada à superfície seguido por um período de incubação. A superfície é então lavada para remover o antígeno não ligado e uma solução contendo um segundo anticorpo, "de

detecção" para hPG é aplicada. O anticorpo de detecção pode ser qualquer um dos anticorpos monoclonais anti-hPG aqui descritos, desde que o anticorpo de ligação se ligue a um epítopo diferente do anticorpo de captura. Por exemplo, se o anticorpo de captura se liga a uma região C-terminal do peptídeo de hPG, então um anticorpo de detecção adequado será aquele que se liga a uma região N-terminal do peptídeo de hPG. Os níveis de progastrina podem ser detectados diretamente (se, por exemplo, o anticorpo de detecção estiver conjugado com um marcador detectável) ou indiretamente (através de um anticorpo secundário marcado que se ligue ao anticorpo anti-hPG de detecção).

[0172] Em uma modalidade específica, os níveis de hPG são medidos a partir de uma amostra de teste como se segue. Placas de microtitulação com 96 poços são revestidas com 0,5 e 10 µg/mL de um anticorpo policlonal de coelho anti-hPG C-terminal e incubadas por uma noite. As placas são lavadas três vezes em PBS-Tween (0,05%) e bloqueadas com leite em pó desnatado 2% (peso/volume) em PBS-Tween (0,05%). Separadamente, as amostras de teste, amostras de controle (em branco ou amostras de plasma ou soro negativas para PG) e, entre cerca de 5 pM ($0,5 \times 10^{-11}$ M) e cerca de 0,1 nM (1×10^{-10} M) de um modelo de referência de hPG (hPG liofilizado diluído em plasma ou soro negativo para PG) são preparadas em um diluente apropriado (por exemplo, PBS-Tween 0,05%). As amostras são incubadas nas placas revestidas entre 2 e 4 horas a 37°C ou alternativamente entre 12 e 16 horas a 21°C. Depois da incubação, as placas são lavadas três vezes com PBS-Tween (0,05%) e incubadas com 0,001 e 0,1 µg/mL de um anticorpo monoclonal anti-hPG N-terminal como aqui descrito, acoplado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Nakane *et al.*, 1974, *J. Histochem. Cytochem.* 22(12): 1084-1091) por 30 minutos a 21°C. Depois, as placas são lavadas três vezes com PBS-Tween (0,05%) e o

substrato para HRP é adicionado por 15 minutos a 21°C. A reação é paralisada pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 0,5M e uma medida da densidade óptica a 405 nm é realizada. Os níveis de hPG da amostra de teste são determinados pela comparação com uma curva padronizada construída a partir das medidas derivadas do hPG padronizado de referência.

[0173] Tipicamente, os pacientes são diagnosticados com base em procedimentos invasivos tais como a avaliação histológica do tecido biopsiado, assim como outros procedimentos invasivos tais como colonoscopia. CRC é dividido em 5 estágios que variam do Estágio 0 (câncer limitado ao revestimento mais interno do cólon ou do reto), Estágio 1 (câncer da parede interna do cólon e do reto), Estágio 2 (câncer que estende através da parede do cólon, mas não encontrado nos linfonodos adjacentes), Estágio 3 (câncer encontrado nos linfonodos adjacentes e no tecido que circunda o cólon e o reto) e Estágio 4 (câncer disseminado para outras partes do corpo). A partir de uma perspectiva histológica, os tumores colorretais apresentam um amplo espectro de neoplasmas, variando entre crescimentos benignos até o câncer invasivo e são tumores predominantemente derivados de epitélio (isto é, adenomas ou adenocarcinomas). As lesões podem ser classificadas em três grupos: pólipos não neoplásicos, pólipos neoplásicos (pólipos adenomatosos, adenomas) e cânceres. Os pólipos adenomatosos são tumores benignos que podem sofrer transformação maligna e têm sido classificados em três tipos histológicos, com potencial crescente de malignização: tubulares, túbulo-vilosos e vilosos. Os adenocarcinomas também foram classificados de acordo com sua histologia em adenocarcinoma mucinoso (coloidal); adenocarcinoma com células em anel de sinete; tumores esquirrosos e neuroendócrino.

[0174] Ao contrário dos meios atuais para diagnosticar CRC, a presente descrição fornece métodos para diagnosticar indivíduos com

CRC na ausência de qualquer análise histológica ou estadiamento da doença, com base nos níveis de hPG que podem ser determinados a partir de uma amostra de sangue. Adicionalmente, os métodos da presente descrição são úteis na seleção de pacientes com CRC adequados para a terapia monoclonal anti-hPG não importando como o paciente tenha sido diagnosticado.

[0175] Os níveis séricos de PG também são úteis na avaliação da eficácia do tratamento de CRC. Consequentemente, a presente descrição fornece um método para monitorar a eficácia da terapia de câncer colorretal, compreendendo determinar os níveis de PG em um paciente que está sendo tratado para CRC. Os métodos para monitorar a eficácia da terapia para o câncer colorretal compreendem determinar repetidamente os níveis de hPG usando um anticorpo monoclonal anti-hPG da presente descrição em um paciente com câncer colorretal submetido ao tratamento de câncer colorretal, em que uma diminuição nos níveis circulantes de hPG no paciente durante um intervalo de tratamento é indicativo da eficácia do tratamento. Por exemplo, uma primeira medida dos níveis circulantes de hPG do paciente pode ser feita seguida por uma segunda medida enquanto ou depois do paciente receber o tratamento para o câncer colorretal. As duas medidas são comparadas depois e uma queda nos níveis de hPG é indicativa de benefício terapêutico.

[0176] Em um aspecto, a descrição fornece um kit para diagnóstico contendo os anticorpos monoclonais anti-hPG (incluindo conjugados de anticorpo). O kit para diagnóstico é uma embalagem que compreende pelo menos um anticorpo monoclonal anti-hPG da descrição (por exemplo, na forma liofilizado ou como uma solução aquosa) e um ou mais reagentes úteis para realizar um ensaio diagnóstico (por exemplo, diluentes, um anticorpo marcado que se ligue a um anticorpo monoclonal anti-hPG, um substrato apropriado para o anticorpo

marcado, hPG em uma forma apropriada para uso como controle positivo e padrão de referência, um controle negativo). Em modalidades específicas, o kit compreende dois anticorpos anti-hPG, em que pelo menos um dos anticorpos é um anticorpo monoclonal anti-hPG. Opcionalmente, o segundo anticorpo é um anticorpo policlonal anti-hPG. Em algumas modalidades, o kit da presente invenção compreende um anticorpo monoclonal anti-hPG N-terminal como aqui descrito.

[0177] Os anticorpos monoclonais anti-hPG podem ser marcados como descrito acima. Alternativamente, o kit pode incluir um anticorpo marcado que se liga a um anticorpo monoclonal anti-hPG e esteja conjugado a uma enzima. Onde o anticorpo monoclonal anti-hPG ou outro anticorpo esteja conjugado a uma enzima para detecção, o kit pode incluir substratos e co-fatores necessários para a enzima (por exemplo, um precursor do substrato que forneça o cromóforo ou fluoróforo detectáveis). Adicionalmente, outros aditivos podem ser incluídos, tal como estabilizadores, tampões (por exemplo, um tampão de bloqueio ou tampão de lise) e semelhantes. Os anticorpos monoclonais anti-hPG incluídos em um kit para diagnóstico podem estar imobilizados sobre uma superfície sólida ou, alternativamente, uma superfície sólida (por exemplo, uma lamina) sobre a qual o anticorpo possa ser imobilizado, é incluída no kit. As quantidades relativas dos vários reagentes podem variar amplamente para fornecer as concentrações em solução dos reagentes que otimizam substancialmente a sensibilidade do ensaio. Os anticorpos e outros reagentes podem ser fornecidos (individualmente ou combinados) como pó seco, geralmente liofilizados, incluindo excipientes sobre os quais a dissolução fornecerá uma solução reagente que possui a concentração apropriada.

[0178] Os kits podem incluir material de instrução contendo instruções (por exemplo, protocolos) para a prática dos métodos de

diagnóstico. Embora o material de instrução compreenda tipicamente materiais escritos ou impressos, ele não está limitado a tal. Um meio capaz de armazenar tais instruções e comunicá-las ao usuário final é contemplado por essa invenção. Tais meios incluem, mas não são limitados a meios de armazenamento eletrônicos (por exemplo, discos, fitas cartuchos, chips magnéticos), meios ópticos (por exemplo CD ROM) e semelhantes. Tais meios podem incluir endereços de sites da internet que fornecem tais materiais de instrução.

10. EXEMPLOS

[0179] Os exemplos a seguir são ilustrativos e não pretendem ser limitantes.

Exemplo 1: Geração de anticorpos monoclonais contra progastrina Imunógenos para a progastrina humana

[0180] Vários imunógenos foram gerados para desenvolver hibridomas que produzam anticorpos monoclonais contra a progastrina humana. Os antígenos previamente usados para gerar os anticorpos policlonais, tais como a progastrina humana de extensão completa e imunógenos baseados nos resíduos 70 a 80 de hPG, falharam em levar a uma resposta imune monoclonal ou em dar origem a anticorpos monoclonais específicos para PG. Como descrito em mais detalhes abaixo, antígenos com 14 aminoácidos e mais longos, que incluíam sequências únicas para hPG na extremidade N-terminal e C-terminal da proteína, foram capazes de induzir uma resposta imune adequada em animais e foram usados para gerar hibridomas que produzem mais de 20 anticorpos monoclonais para hPG diferentes. Surpreendentemente, vários imunógenos, que incluíam os resíduos 55 a 80 de hPG, alguns dos quais também são encontrados em outros peptídeos derivados do gene de gastrina, foram usados com sucesso para gerar anticorpos monoclonais que eram específicos para hPG. A tabela abaixo resume os imunógenos testados.

Tabela 2

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

* Os camundongos imunizados não apresentaram qualquer resposta imune.

[0181] Os imunógenos listados na Tabela 2 foram feitos de acordo com técnicas conhecidas, usando a síntese química da sequência do peptídeo e do ligante, seguida pela reticulação com o veículo Albumina Sérica Bovina (BSA), Hemocianina de Keyhole Limpet (KHL) ou Toxina Diftérica (DT) usando um agente de reticulação apropriado (por exemplo, MBS (éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida), glutaraldeído ou Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato). (Coligan JE *et al.*, Current protocols in Immunology, Vol. 2, New York: John Wiley and Sons; 1996, p 9.0.1-9.0.15; Harlow DL. Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1998, p72-87). Os ligantes usados eram um ou dois resíduos de ácido aminohexanoíco (Ahx) acoplados a um resíduo de cisteína.

[0182] Em cada um dos três experimentos, os camundongos Balb/c foram inoculados 4 a 5 vezes com imunógenos N-terminais e 2 a 4 vezes com imunógenos C-terminais. Cada injeção administrava 10 µg do imunógeno com Ribi, Alun ou adjuvante de Freund.

Fusões celulares e rastreamento do hibridoma

[0183] O soro de cada camundongo foi testado por ELISA contra o imunógeno e os esplenócitos foram coletados dos camundongos com a resposta imune mais forte. Os esplenócitos foram fundidos com células Sp2 de mieloma usando polietileno glicol e semeados em placas de 96 poços com uma densidade de 15.000 a 35.000 células por poço. As células fundidas foram selecionadas usando um meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT).

[0184] Os sobrenadantes dos hibridomas foram rastreados por ELISA quanto a habilidade de se ligar ao imunógeno e a progastrina de extensão completa. Três rodadas de rastreamento foram realizadas para garantir que apenas hibridomas que produzem estavelmente os anticorpos que reconhecem hPG de extensão completa e o imunógeno fossem selecionados.

[0185] O rastreamento dos hibridomas e dos anticorpos monoclonais para determinar a ligação aos diferentes peptídeos de PG foi realizado usando uma técnica ELISA como descrita abaixo. Esse protocolo foi usado para rastrear a ligação a PG de esplenócitos fundidos, a primeira e a segunda rodadas de sub-clones, assim como para verificar a especificidade dos anticorpos para PG, quando comparados com outros peptídeos derivados do gene da gastrina.

[0186] Resumidamente, placas de 96 poços foram incubadas por uma noite a 4°C com as concentrações apropriadas de um peptídeo de teste em Salina Tamponada com Fosfato (PBS), depois do que os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem (PBS e Tween-20 0,1%) e incubados por 2 horas a 22°C com 100 µL de solução de bloqueio (PBS, Tween-20 0,1%, Albumina Sérica Bovina 0,1% ou hidrolisado de caseína) por poço. Depois do bloqueio, os poços foram lavados três vezes e o anticorpo primário – o anticorpo a ser ensaiado – adicionado. Para o rastreamento inicial de esplenócitos fundidos, 50 µL de sobrenadante de cultura de cada cultura foram adicionados a

cada poço na placa. Em ensaios realizados sobre anticorpos monoclonais, 100 µL do anticorpo de teste em PBS e Tween-20 0,1% foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas por 2 horas a 22°C, depois do que a solução de anticorpo primário foi descartada e substituída, depois de uma etapa de lavagem (3X 100 µL de solução de lavagem, como observado acima), com solução de bloqueio contendo o anticorpo secundário, que se liga ao anticorpo primário e está acoplado a uma enzima. O anticorpo secundário era um anticorpo de cabra anti-IgG (Fc) de camundongo acoplado a peroxidase de rábano silvestre. Depois de 1 hora de incubação com o anticorpo secundário, 100 µL de solução de substrato (por exemplo, Fast OPD ou dihidrocloreto de O-fenileno diamina, disponibilizado por Sigma-Aldrich Co., preparado de acordo com as instruções do fabricante) foram adicionados a cada poço e incubados no escuro por 20 minutos a 22°C. A reação foi paralisada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 4 N e a quantidade de substrato catalisado determinada pela medição da densidade óptica (O.D.) a 492 nm. A conversão do substrato é proporcional à quantidade de anticorpo primário (de teste) ligado ao antígeno. Os experimentos foram corridos em duplicata e as medidas de OD plotadas como uma função da concentração de antígeno ou de anticorpo dependendo da meta do experimento. As amostras foram classificadas como positivas para anticorpos anti-PG se as OD medidas estivessem entre 0,2 e 1,5. O mesmo suporte de O.D. foi usado para identificar os anticorpos que se ligaram ao peptídeo imunogênico usado para inocular os animais de teste.

[0187] Materiais e reagentes exemplificadores usados no ensaio são os seguintes:

Item	Fonte	Referência
Placas de 96 poços Greiner Microlon	Dutscher	# 655092
10X DPBS	Dutscher	# P04-53500

Tween-20	Sigma	# 63158
BSA (para o bloqueio)	Euromedex	# 04-100-810-C
Hidrolisado de caseína (quando usado no lugar de BSA)	Sigma	22090
Sobrenadantes de hibridoma ou anticorpos monoclonais N-terminal ou C-terminal	BioRéalités	Como aqui descrito
IgG (Fc) de cabra anti-camundongo, acoplada a peroxidase	Thermo	# 31439
Fast OPD	Sigma	# P9187
Ácido sulfúrico 95-97%	Sigma	# 30743

[0188] Peptídeos exemplificadores usados no rastreamento de hibridomas e anticorpos monoclonais foram os seguintes:

Peptídeos para rastreamento	Fonte	Referência
BSA	Euromedex	# 04-100-810-C
Progastrina recombinante humana	BioRéalités	McQueen <i>et al.</i> , 2002, J. Protein Chem., 21(7):465-471.
Gastrina I humana (G-17)	Sigma	# 53673
Gastrina 17 (G-Gly) prolongada com glicina	Auspel	# S10082
KLH	Pierce (Perbio)	# 77653
peptídeo flanqueador C-terminal (CTFP)	Auspel	# R41345

[0189] A progastrina recombinante humana foi produzida como descrito por McQueen *et al*, 2002, J. Protein Chem. 21: 465-471) com pequenas modificações. Resumidamente, células bacterianas BL21 DE3 Star (InVitrogen) foram transformadas com um vetor contendo a sequência de extensão completa de progastrina humana em um arcabouço PGEX-GST-TEV (GE Healthcare). As bactérias foram cultivadas em meio LB contendo IPTG 0,5 mM por 3 horas a 37°C. Os péletes bacterianos foram quebrados usando uma French Press, e as frações solúveis assim como as não solúveis foram separadas por centrifugação. Depois, hPG marcada com GST foi isolada usando uma coluna de afinidade com glutatona e PG foi clivada de GST a protease

Nla do Vírus do Mosaico do Tabaco (TEV) protease. Finalmente, PG foi dialisada contra o tampão final (Hepes 10mM, BSA 0,5 %, pH 7.4).

[0190] Os hibridomas foram clonados inicialmente, depois subclonados e amplificados. Os hibridomas positivos foram selecionados com base nos seguintes critérios: (1) PG e especificidade do imunógeno, (2) afinidade relativa dos anticorpos, (3) crescimento da célula do hibridoma, (4) secreção de anticorpo e (5) monoclonalidade dos hibridomas. Os ensaios e os critérios de seleção foram os seguintes.

[0191] Para a especificidade, os sobrenadantes dos hibridomas de teste foram ensaiados por ELISA como descrito acima (50 µL de uma diluição 1 para 2 de sobrenadante em meio de ensaio PBS). Os hibridomas foram classificados como positivos se a medida de O.D. estivesse entre 0,2 e 1,5 em um ensaio com PG ou com o imunógeno usado para inocular os camundongos de teste. Como um critério adicional para a especificidade, os clones foram selecionados com base na ausência de ligação a outros peptídeos derivados do gene de gastrina. A ausência de ligação foi medida como não uma diferença estatisticamente significativa entre os poços de teste e o sinal médio dos poços de controle que contêm apenas PBS.

[0192] Para a caracterização da afinidade, diluições seriadas de anticorpos foram ensaiadas por ELISA pela ligação a hPG como descrito acima. As diluições padronizadas usadas nos ensaios de anticorpos N-terminais foram 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 ng/mL. As diluições padronizadas usadas nos ensaios de anticorpos C-terminais foram 0, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 ng/mL.

[0193] O crescimento das células do hibridoma através de múltiplas rodadas de cultura seriada foi avaliado pela observação microscópica dois dias depois da semeadura. As células são esperadas proliferar e preencher o poço 48 horas depois da semeadura. A diluição seriada (tipicamente, uma primeira diluição 1:5, seguida por pelo menos 2

diluições adicionais em 1:10) foi realizada, seguida pela observação microscópica em 48 horas para confirmar o crescimento adequado. As células dos hibridomas que preenchiam esse critério foram diluídas e semeadas de novo para serem observadas sob microscópio 48 h mais tarde. Tais rodadas de "diluição-semeadura-observação" foram repetidas 3 vezes antes que um hibridoma fosse classificado como preenchendo os critérios de "crescimento".

[0194] A secreção do anticorpo foi testada pela realização de ELISAs usando hPG como descrito acima em diluições seriadas (1/2, 1/20, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/2000) de sobrenadantes sem células.

[0195] A monoclonalidade foi determinada pela semeadura de um clone ou hibridoma em uma placa de 96 poços em uma densidade de 0,6 células/poço e incubando por duas semanas. Em duas semanas, os sobrenadantes foram ensaiados quanto a ligação a hPG por ELISA e a natureza clonal da população determinada com base na existência de um valor de O.D. consistente através de pelo menos 90% dos poços que continham células vivas.

Anticorpos monoclonais contra progastrina de extensão completa

[0196] Cada um dos três camundongos foi inoculado com progastrina recombinante humana (descrita acima). O imunógeno falhou em desencadear qualquer resposta imune detectável nos camundongos: nenhuma ligação a PG pode ser detectada usando um ELISA como descrito acima. Nenhuma fusão foi realizada.

Anticorpos monoclonais N-terminais contra progastrina

[0197] Como observado acima, os anticorpos monoclonais N-terminais foram gerados contra um antígeno que continha os resíduos 1 a 14 de hPG ligados a albumina sérica bovina (BSA) ou a hemocianina de keyhole limpet (KLH) por meio de um ligante Ahx-Cys na extremidade C-terminal do antígeno com 14 resíduos (SWKPRSQSQPDAPLG-Ahx-Cys (SEQ ID NO: 26)).

[0198] Em um primeiro experimento, três camundongos foram inoculados com um peptídeo N-terminal ligado por BSA. Das três fusões realizadas com esplenócitos de dois dos três camundongos, uma fusão não forneceu clones que mostrassem ligação com PG ou com o imunógeno. Das duas outras fusões semeadas em placas de 96 poços, uma gerou 4 hibridomas que se ligam a PG e específicos para PG, a partir dos quais um único subclone estável que produz IgG foi recuperado. A segunda fusão também resultou em um subclone de hibridoma único estável que produz IgG1, que se liga a PG e específico para PG. No total, dos três camundongos, 17 hibridomas da primeira rodada ou 0,74% dos hibridomas rastreados foram positivos para a ligação a PG e ao imunógeno, a partir dos quais 9 linhagens celulares positivas foram subclonadas, das quais 2 eram linhagens celulares positivas, que produzem IgG. Portanto, o primeiro experimento gerou dois clones depois de uma dupla de rodadas de subclonagem que retiveram um sinal positivo forte contra o imunógeno e hPG (positivos para "ligação a PG") e que não se ligaram a outros peptídeos derivados do gene de gastrina (positivos para "específico para PG"): hibridomas 43B9G11 que WE5H2G7, que produzem MAb1 anti-hPG e MAb 2□ anti-hPG, respectivamente.

[0199] Em um segundo experimento, os camundongos foram inoculados com um peptídeo N-terminal ligado a KLH. Duas fusões foram realizadas com células Sp2 de mieloma. Dessa, apenas uma fusão gerou clones positivos para PG e para o imunógeno, que também eram específicos para PG. A partir disso, 1920 hibridomas foram semeados. Vários hibridomas testaram positivos com peptídeos imunizantes, mas não com progastrina ou não eram específicos para PG. Especificamente, 297 hibridomas mostraram um sinal positivo forte para o peptídeo imunizante (cerca de 15,5% de 1920), dos quais 124 também eram positivos para a ligação a progastrina (6,5%). Havia 36

hibridomas ou 1,8% que eram positivos para progastrina, mas não para o imunógeno usado. Apenas 12 hibridomas dos 1920 semeados forneceram anticorpos que se ligam especificamente a progastrina, mas não a outros produtos do gene de gastrina (0,6% do total de hibridomas, 3,6% dos clones que foram positivos para o peptídeo e/ou progastrina no primeiro rastreamento). Dos 12 clones selecionados, apenas 2 eram estáveis o suficiente para serem estabelecidos como clones permanentes e congelados para armazenamento a longo prazo. Portanto, no segundo experimento, dos quase 2000 hibridomas semeados, apenas 2 clones, 6B5B11C10 (que produz MAb 3 anti-hPG) e 20D2C3G2 (que produz MAb 4), que produzem MAb3 e MAb4 anti-hPG, respectivamente, foram recuperados, que expressam anticorpos monoclonais capazes de se ligar a hPG e ao peptídeo imunizante, que possuem especificidade para progastrina sobre ou outros produtos do gene de gastrina e alta afinidade por hPG. Ambos anticorpos exemplificadores são do isotipo IgG1.

[0200] Em um terceiro experimento, os camundongos foram inoculados com o mesmo imunógeno como no segundo experimento. As fusões de células Sp2 de mieloma foram realizadas com esplenócitos a dois camundongos com a resposta imune mais forte. Os hibridomas foram semeados a partir das fusões (3840 hibridomas por cada fusão, por camundongo) e os sobrenadantes testados quanto a ligação a PG e ao imunógenos, assim como a especificidade por PG. De cada fusão, 6 hibridomas mostraram especificidade por PG, a partir dos quais 3 subclones foram selecionados que satisfizeram a seleção posterior de crescimento, monoclonalidade, secreção de anticorpo e afinidade relativa. Portanto, em todos, 2,9% dos hibridomas testados depois da semeadura (220/7680) eram positivos para PG e para o imunógeno, dos quais 0,15% eram clones positivos (12/7680), os subclones finais recuperados constituindo 0,15% dos hibridomas

originais semeados (6/7680). Esse experimento gerou os hibridomas 1E9A4A4 (que produz MAb 15 anti-hPG), 1E9D9B6 (que produz MAb 16 anti-hPG), 1C8D10F5 (que produz MAb 17 anti-hPG), 1A7C3F11 (que produz MAb 18 anti-hPG), 1B3B4F11 (que produz MAb 19 anti-hPG), e 1C11F5E8 (que produz MAb 20 anti-hPG).

[0201] A tabela abaixo mostra o número de clones semeados para cada experimento, o imunógeno usado e o número e o percentual de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais que reconheceram o imunógeno e a progastrina de extensão completa.

Tabela 3

Exp.	Imunógeno	Clones semeados	Sobre-nadante de hibridoma PG+	Clones específicos para PG	Subclones específicos para PG, que produzem IgG
1	(SEQ ID NO: 26)-Ahx-Cys-BSA	2304	17 (0,74%)	9 (0,39%)	2 (0,087%)
2	(SEQ ID NO: 26)-Ahx-Cys-KLH	1920	124 (6,5%)	12 (0,6%)	2 (0,1%)
3	(SEQ ID NO: 26)-Ahx-Cys-KLH	7680	220 (2,9%)	12 (0,15%)	6 (0,1%)

Anticorpos monoclonais C-terminais contra progastrina

[0202] Anticorpos monoclonais C-terminais foram gerados contra um antígeno que contém os resíduos 55 a 80 de hPG ligada a KLH ou DT por meio de um ligante Cys-Ahx-Ahx da extremidade N-terminal do resíduo 26 do antígeno (Cys-Ahx-Ahx-QGPWLEEEEAYGWMDF-GRRSAEDEN (SEQ ID NO: 96)). As tentativas para gerar os hibridomas com um antígeno menor contendo apenas os resíduos 70 a 80 de hPG, Cys-Ahx-Ahx-FGRRSAEDEN (SEQ ID NO: 97), conjugado com BSA ou KLH, falharam em geral qualquer clone.

[0203] Três experimentos foram realizados. Nos primeiros dois experimentos, nos quais foi usado o peptídeo mais curto, nenhum subclone foi recuperado. Especificamente, em um primeiro experimento, 4 camundongos foram inoculados com um peptídeo C-terminal que corresponde a SEQ ID NO: 97, ligado a BSA. Nenhuma das fusões gerou qualquer hibridoma produtor de IgG. Em um segundo experimento, 6 camundongos foram inoculados, 3 cada, com um peptídeo que corresponde a SEQ ID NO: 97 ligado a KLH na sua extremidade N-terminal ou com um peptídeo que corresponde a SEQ ID NO: 97 ligado a KLH na sua extremidade C-terminal. Para o primeiro imunógeno, as fusões foram realizadas e os hibridomas foram recuperados, mas nenhum subclone positivo para a ligação a PG e especificidade por PG foi isolado. Para o segundo imunógeno, nenhum dos camundongos desenvolveu uma resposta imune e nenhuma fusão foi realizada.

[0204] Em um terceiro experimento, um peptídeo com 26 aminoácidos que inclui as sequências C-terminais não exclusivas para hPG, foi usado. O imunógeno, que incluía um peptídeo que corresponde a SEQ ID NO: 96 ligada a KLH ou DT, foi injetado nos camundongos. As fusões a células Sp2 de mieloma foram realizadas com esplenócitos dos dois camundongos que tiveram a resposta mais forte. 3840 hibridomas foram semeados a partir de uma fusão por camundongo. Do total, de 7680 hibridomas rastreados, dos quais 382 (5%) eram positivos para PG e específicos para PG, 13 (0,17%) subclones estáveis, positivos foram recuperados: 1B4A11D11 (que produz MAb 5 anti-hPG), 1B6A11F2 (que produz MAb 6 anti-hPG), 1B11E4B11 (que produz MAb 7 anti-hPG), 1C10D3B9 (que produz MAb 8 anti-hPG), D8F5B3 (que produz MAb 9 anti-hPG), 1E1C7B4 (que produz MAb 10 anti-hPG), 2B4C8C8 (que produz MAb 11 anti-hPG), 2B11E6G4 (que produz MAb 12 anti-hPG), 2C6C3C7 (que produz MAb 13 anti-hPG), 2H9F4B7 (que

produz MAb 14 anti-hPG), 1F11F5E10 (que produz MAb 21 anti-hPG), 1F11F5G9 (que produz MAb 22 anti-hPG), e 1A11F2C9 (que produz MAb 23 anti-hPG).

[0205] A tabela abaixo mostra o número de clones semeados para cada experimento, o imunógeno usado, o número de hibridomas rastreados, o número e o percentual de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais que se ligam a PG e ao imunógeno, que são específicos para PG e reúnem os critérios de seleção (crescimento, monoclonalidade, afinidade relativa, etc.) depois de três rodadas de subclonagem.

Table 4

Exp.	Imunógeno	Clones semeados	Sobrenadante de hibridoma PG+	Clones específicos para PG	Subclones específicos para PG-, que produzem IgG
1	BSA-ligante-(SEQ ID NO: 97)	3072	10 (0,32%)	9 (0,29%)	0
2	KLH- ligante -(SEQ ID NO: 97) (SEQ ID NO: 97)- ligante -KLH	1920	27 (0,47%) 0	4 (0,07%) 0	0
3	KLH- ligante -(SEQ ID NO: 96) DT- ligante -(SEQ ID NO: 96)	3840 3840	192 (5%) 190 (4,95%)	17 (0,44%) 13 (0,34%)	10 (0,26%) 3 (0,08%)

[0206] Os anticorpos monoclonais e os hibridomas estáveis a partir dos quais eles são produzidos, estão detalhados na tabela abaixo:

Tabela 5

Anticorpo monoclonal	Hibridoma	Ig de Camundongo
MAb 1	43B9G11	IgG1

Tabela 5

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

[0207] As linhagens celulares de hibridoma 1B4A11D11 (MAb 5, no. de registro CNCM I-4371), 1B6A11F2 (MAb 6, no. de registro CNCM I-4372), 1B11E4B11 (MAb 7, no. de registro CNCM I-4373), 2B4C8C8 (MAb 11, no. de registro CNCM I-4374), 2B11E6G4 (MAb 12, no. de registro CNCM I-4375), e 1E9A4A4 (MAb 15, no. de registro e CNCM I-4376) foram depositadas de acordo com o Tratado de Budapeste e

recebidas em 6 de outubro de 2010 pela Collection Nationale de Cultures de Microorganisms (CNCM), Institut Pasteur, Paris, França.

Clonagem e sequenciamento de anticorpos monoclonais anti-hPG

[0208] Os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas podem ser clonados e sequenciados usando técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica. Os anticorpos monoclonais dos hibridomas listados na Tabela 5 acima foram sequenciados como descrito abaixo.

[0209] As sequências que codificam os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas 6B5B11C10 e 20D2C3G2 foram clonadas e sequenciadas usando técnicas padronizadas. Resumidamente, oRNA total foi isolado a partir de peletes de células congeladas usando o reagente RNABee, no. de catálogo da AMSBio CS-104B, usado de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA para as regiões V foi preparado a partir de mRNA usando a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR), seguida pela amplificação rápida a 5' das extremidades de cDNA (RACE). A síntese de cDNA foi realizada usando iniciadores específicos para a região constante, depois do que o produto da primeira fita foi purificado e foi usada a desoxinucleotídeo transferase para adicionar caudas homopoliméricas às extremidades 3' do cDNA. As sequências "com cauda" de cDNA foram então amplificadas por PCR usando pares de iniciadores, um par para cada cauda homopolimérica e para a região V_H ou V_L, respectivamente. Os produtos de PCR da região variável da cadeia pesada e leve foram então clonados em um vetor de clonagem "TA" (p-GEM-T easy, Promega cat. no A 1360) e sequenciados usando procedimentos padronizados. *Veja FIG. 2A-B (MAb 3), FIG. 2C-D (MAb 4).*

[0210] As sequências que codificam os anticorpos monoclonais produzidos pelos hibridomas 1C10D3B9, 2C6C3C7, 1B3B4F1, e 1E9D9B61 foram determinadas como se segue. O RNA total foi isolado

de péletes de célula congelada usando o kit RNAqueous®-4PCR kit (Ambion cat. No. AM1914) usado de acordo com as instruções do fabricante. O mRNA da região V da cadeia pesada foi amplificado usando um conjunto de seis pools de iniciador degenerado (HA a HF) e o mRNA da região V da cadeia leve foi amplificado usando um conjunto de oito pools de iniciador degenerado, sete para o cluster κ (KA a KG) e um para o cluster λ (LA). O cDNA das regiões variáveis foi preparado a partir de mRNA usando RT-PCR. A síntese de cDNA foi realizada usando iniciadores específicos para a região constante, seguida pela PCR usando pools de iniciadores degenerados para as sequências de sinal 5' de murino e iniciadores para as regiões constantes 3' para cada um de IgGVH, IgκVL e IgλVL. (Jones *et al.*, 1991, *Rapid PCR cloning of full-length mouse immunoglobulin variable regions*, Bio/Technology 9:88-89). Os produtos de PCR da região variável de cadeia leve e pesada foram então clonados em um vetor de clonagem "TA" (p-GEM-T easy, Promega cat. no A 1360) e sequenciados usando procedimentos padronizados. Veja FIGs. 2E-F (MAb 8), 2G-H (MAb 13), 2I-J (Mab 16), e 2K-L (Mab 19).

Exemplo 2: Afinidade de ligação de anticorpos anti-hPG

A. Afinidade Relativa

[0211] A afinidade relativa de anticorpos monoclonais exemplificadores foi medida usando o método ELISA descrito acima, no qual os poços foram revestidos com uma solução de peptídeo contendo 50 ng de progastrina e depois incubados na presença de concentrações crescentes de cada um dos anticorpos monoclonais como a seguir:

Anticorpo monoclonal	Faixa de concentração testada
Anticorpos monoclonais N-terminais MAbs 1-4 anti-hPG	0,001-1 µg/mL
Anticorpos monoclonais N-terminais MAbs 3, 15-20 anti-hPG	0,1-100 ng/mL
Anticorpos monoclonais C-terminais MAbs 5-14, 21-23 anti-hPG	0,03-30 ng/mL

[0212] A FIG 3A mostra a afinidade relativa de quatro anticorpos monoclonais anti-hPG, MAbs 1-4 testados em concentrações de 1 ng/mL a 1 μ g/mL. A FIG 3B mostra a afinidade relativa de anticorpos monoclonais N-terminais anti-hPG MAbs 3 e 15-20 testados em concentrações de anticorpo de 0,1 a 100 ng/mL. A FIG. 3C mostra a afinidade relativa de anticorpos monoclonais C-terminais anti-hPG MAbs 5-14 e 21-23 testados em concentrações de anticorpo de 0,03 a 30 ng/mL.

B. Medidas de constante de afinidade

[0213] Para fornecer uma quantificação mais absoluta da afinidade para os anticorpos monoclonais, as constantes de afinidade foram medidas usando a Proteon Technique (BioRad), de acordo com Nahshol *et al.*, 2008, *Analytical Biochemistry* 383:52-60, incorporado aqui por referência em sua totalidade. Resumidamente, um anticorpo anti-IgG de camundongo (50 μ g/mL) foi revestido primeiro em um chip sensor, tornando seguro que o sinal detectado pelo chip depois da injeção de anticorpo caísse entre 10.000 e 11.500 RU (unidades de resposta). O anticorpo monoclonal de murino a ser testado foi injetado depois (concentrações típicas: 30 μ g/mL). A ligação suficiente do anticorpo a ser testado foi determinada com base em um sinal adicional de pelo menos 500 RU sobre o chip sensor. Uma interação ao longo do tempo entre anticorpos monoclonais anti-progastrina e progastrina foi medida pela injeção de concentrações variáveis de progastrina, por exemplo, 200, 100, 50, 25 e 12,5 nM e o nível de associação detectado. Tipicamente, vários canais estão disponíveis para testar múltiplos anticorpos em paralelo em um único experimento, tornando possível ensaiar a ligação de anticorpos de teste em concentrações variáveis de PG em paralelo. Tipicamente, um canal é reservado para um anticorpo monoclonal de murino que não seja específico para PG, como um controle para a ligação não específica e outro canal é inoculado com

uma diluição apenas de tampão como uma linha de base para o sinal de fundo. Geralmente, nenhuma ligação é detectável nos canais injetados com anticorpo de murino não específico. Os anticorpos que exibem um alto nível de associação nessa configuração, que pode resultar na saturação do anticorpo monoclonal capturado pela progastrina, podem ser testados contra concentrações menores de progastrina (50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 nM), permitindo uma medida mais refinada.

[0214] As constantes de afinidade (KD) foram calculadas como a razão entre a constante de dissociação (kd) e a constante de associação (ka). Os valores experimentais foram validados pela análise da similaridade estatisticamente relevante entre curvas experimentais baseadas nas medidas de ligação e nos perfis teóricos. O modelo matemático usado nos experimentos Proteon para selecionar se as curvas experimentais se ajustam com o modelo teórico foi o modelo de Langmuir, baseado na interação 1:1 entre as moléculas de progastrina e anticorpos monoclonais anti-progastrina.

Tabela 6

Anticorpo Monoclonal	Constante de afinidade medida Kd (M)
MAb 1 Anti-hPG	2,5 μ M (2,5 x10-6M)
MAb 2 Anti-hPG	185 nM (1,85 x10-7M)
MAb 3 Anti-hPG	6,4 nM (6,4 x10-9M)
MAb 4 Anti-hPG	3,5 nM (3,5 x10-9M)
MAb 5 Anti-hPG	13 pM (1,30 x10-11M)
MAb 6 Anti-hPG	0,6 nM (6,38 x10-10M)
MAb 7 Anti-hPG	58 pM (5,84 x10-11M)
MAb 8 Anti-hPG	0,1 nM (1,08 x10-10M)
MAb 10 Anti-hPG	3,6 nM (3,62 x10-9M)
MAb 11 Anti-hPG	0,3 nM (3,12 x10-10M)
MAb 12 Anti-hPG	0,4 nM (4,43 x10-10M)

Tabela 6

Anticorpo Monoclonal	Constante de afinidade medida Kd (M)
MAb 13 Anti-hPG	0,6 nM (6,12 x10-10M)
MAb 14 Anti-hPG	6,8 pM (6,86 x10-12M)
MAb 15 Anti-hPG	0,2 nM (2,11 x10-10M)
MAb 16 Anti-hPG	0,2 nM (2,78 x10-10M)
MAb 17 Anti-hPG	8,3 nM (8,29 x10-9M)
MAb 18 Anti-hPG	1,2 nM (1,24 x10-9M)
MAb 19 Anti-hPG	0,7 nM (7,79 x10-10M)
MAb 20 Anti-hPG	0,2 nM (2,47 x10-10M)
MAb 21 Anti-hPG	3,9 nM (3,90 x10-9M)
MAb 22 Anti-hPG	5 nM (4,94 x10-9M)
Anti-hPG MAb 23	0,4 μ M (3,99 x10-7M)

Exemplo 3: Agregação de anticorpos anti-hPG

[0215] A agregação de anticorpos pode reduzir a eficácia terapêutica pela redução da quantidade de anticorpo disponível para se ligar a proteína alvo. Os anticorpos com níveis muito baixos de agregação são preferíveis para as aplicações terapêuticas. Cada lote de anticorpo variará comparado com outros lotes do mesmo anticorpo monoclonal. É geralmente desejável usar lotes com agregação baixa. Para quantificar a agregação de anticorpo, soluções de anticorpo foram colocadas em um espectrofluorímetro (Photon Technology International) e irradiadas a 280 nm. A difusão foi medida a 280 nm, enquanto que a emissão devida a aminoácidos aromáticos (a maioria de triptofanos) foi medida a 330 nm. O nível de agregação foi quantificado então pelo cálculo da proporção entre os valores medidos de OD a 280 nm versus 330 nm, como descrito em *Nominé et al.*, 2003, *Biochemistry* 42: 4909-4917. Uma proporção maior do que 280/330 nm indica uma quantidade maior de agregação. A concentração de anticorpos usada foi de 15 μ g/mL, 5 a 15 vezes acima daquela usada para os tratamentos *in vitro*.

[0216] Os resultados são mostrados na Tabela 7 abaixo e na FIG. 14.

Tabela 7	
Amostra	Proporção 280/330 nm
Albumina Sérica Bovina (n=1)	6,4
MAb 1 Anti-hPG (n=1)	15,42
MAb 2 Anti-hPG (n=2)	9,81
MAb 3 Anti-hPG (n=2)	3,08
MAb 4 Anti-hPG (n=2)	1,94

Exemplo 4: Especificidade de ligação de anticorpos monoclonais anti-hPG

[0217] PG é apenas um dos produtos de peptídeo do gene da gastrina. Outros produtos do gene da gastrina possuem papéis na homeostase normal, mas é o papel de PG em CRC que a torna um alvo útil para os propósitos terapêuticos e diagnósticos. Os anticorpos monoclonais aqui descritos são específicos para a progastrina de extensão completa sobre todos os outros peptídeos que resultam da expressão e do processamento do gene de gastrina, tal como gastrinas estendida com glicina (G17-gly), amidada (Gastrina 17) e o peptídeo flanqueador C-terminal (CTFP). Esses peptídeos estão presentes na circulação. A especificidade de ligação de anticorpos monoclonais anti-hPG foi determinada pelo ensaio dos anticorpos contra a progastrina humana e outros peptídeos derivados do gene de gastrina, usando o ensaio ELISA descrito acima no Exemplo 1.

[0218] Especificamente, os poços revestidos com uma solução contendo um dos seguintes peptídeos nas quantidades indicadas: progastrina, hemocianina de keyhole limpet (KLH), gastrina-17 amidada (G17), gastrina 17 estendida com glicina (Ggly) ou Peptídeo Flanqueador C-terminal (CTFP):

Peptídeos rastreados	Quantidade de teste
Progastrina Recombinante	50 ng (exp. 1) 25 ng (exp. 2)
Gastrina I Humana amidada (G-17)	50 e 250 ng
gastrina 17 estendida com glicina (G17-Gly)	50 e 250 ng
KLH	50 e 250 ng
Peptídeo flanqueador C-terminal (CTFP)	50 e 250 ng

[0219] Em um primeiro experimento, 3 ng/mL (0,3 ng) de Mab 3 anti-hPG e 1 µg/mL (0,1 µg) de cada um dos MAbs 1, 2, e 4 anti-hPG foram usados. Veja a FIG 5A. Em um segundo experimento, a especificidade de ligação de MAbs 5 a 14 e 21-23 anti-hPG foi testada a 0,3 ng/mL, veja FIG 5B, a especificidade de ligação de MAbs 3, 15-20 anti-hPG foi testada a 1 ng/mL, veja FIG 5C.

[0220] Os anticorpos apresentaram uma reação fraca a grandes quantidades deKLh que foi acoplada ao peptídeo antigênico usado em alguns dos imunógenos para imunizar os camundongos no Exemplo 1 acima. Não houve efeito detectável de BSA sobre a ligação de PG de quaisquer anticorpos, incluindo aqueles surgidos contra os imunógenos que incluíam BSA como veículo.

[0221] Todos os anticorpos apresentaram alta especificidade pela ligação a hPG de extensão completa (testada a 50 e depois 25 ng) quando comparada com outros peptídeos derivados do gene da gastrina, tais como gastrina-17 amidada, gastrina 17 estendida com glicina e o peptídeo flanqueador C-terminal, um peptídeo com 5 aminoácidos que é clivado da progastrina durante o processamento normal do polipeptídeo para formar a gastrina. Os anticorpos exemplificadores não mostraram ligação detectável (sinal acima do fundo de "PBS isolado") a qualquer um dos peptídeos derivados do gene de gastrina diferentes de hPG.

Exemplo 5: Ensaio de Competição

[0222] A habilidade de um anticorpo monoclonal anti-hPG em competir com um anticorpo policlonal anti-hPG pela ligação a progastrina foi determinada usando um ELISA com um anticorpo anti-hPG de "captura" e um anticorpo anti-hPG de "detecção". O MAb 3 anti-hPG foi ensaiado como a seguir: placas de 96 poços foram pré-revestidas com anticorpos policlonais C-terminais para progastrina, originados contra um peptídeo que consiste nos resíduos 71 a 80 de hPG. As placas foram então incubadas com 100 pm de progastrina, seguida pela adição de 10 µg/mL de anticorpo policlonal N-terminal anti-hPG biotinilado, originado contra um peptídeo que consiste da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 e concentrações crescentes do anticorpo monoclonal MAb 3 anti-hPG. A ligação do anticorpo policlonal N-terminal anti-hPG biotinilado foi detectada pela incubação das placas com estreptavidina-HRP seguido por OPD de acordo com protocolos padronizados. A ligação foi medida pela quantificação da luminescência.

[0223] Os resultados mostram que concentrações crescentes (µg/mL) de MAb 3 anti-hPG diminuem a habilidade de anticorpos policlonais anti-hPG de se ligar a progastrina, mostrando que o anticorpo monoclonal compete com o anticorpo policlonal. Veja a FIG. 6.

Exemplo 6: Mapeamento de epítopo

[0224] Os epítopos específicos ligados por anticorpos monoclonais exemplificadores foram mapeados usando a técnica SPOT e o rastreamento de alanina, como descrito em Laune, D., *et al.*, 2002, *J. Immunol. Methods* 267:53-70 e Laune, D., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:30937-30944, respectivamente. Na técnica SPOT, sequências de peptídeo com 15 aminoácidos que abrange um epítopo putativo são geradas e colocadas sobre uma membrana de nitrocelulose que é então sondada com o anticorpo de teste para determinar a sequência mínima do epítopo reconhecida pelo anticorpo. O rastreamento de

alanina é usado para determinar os resíduos dentro de um epítopo que são críticos para a ligação ao anticorpo: cada resíduo dentro de um epítopo putativo é mutado um a um para uma alanina e os peptídeos contendo alanina são então sondados com o anticorpo de teste.

[0225] Famílias de epítopos foram identificadas para anticorpos exemplificadores da presente descrição. Para anticorpos monoclonais N-terminais de MAbs 1-4 e 15-20 de hPG, os epítopos compreendem pelo menos as seguintes sequências: DAPLG (SEQ ID NO: 28), PDAPLG (SEQ ID NO: 29), PRSQQPD (SEQ ID NO: 30), WKPRSQQPD (SEQ ID NO: 31), ou WKPRSQQPDAPLG (SEQ ID NO: 32), como mostradas na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8		
MAb	Antígeno peptídico de PG: SWKPRSQQPDAPLG	SEQ ID NO
MAb 2	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 4	WKPRSQQPDAPLG	32
MAb 1	PDAPLG	29
MAb 3	DAPLG	28
MAb 17	WKPRSQQPD	31
MAb 18	WKPRSQQPD	31
MAb 19	WKPRSQQPD	31
MAb 20	WKPRSQQPD	31
MAb 15	PRSQQPD	30
MAb 16	PRSQQPD	30

[0226] Para os anticorpos monoclonais C-terminais de MAbs 5-7, 9-12, 14 e 21-23 de hPG, os epítopos compreendem pelo menos as seguintes sequências: FGRR (SEQ ID NO: 33), MDFGR (SEQ ID NO: 34), AEDEN (SEQ ID NO: 35), e GWMDFGRR (SEQ ID NO: 36), como mostradas na Tabela 9 abaixo.

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

Exemplo 7: Atividade neutralizante de anticorpos anti-hPG sobre linhagens celulares de câncer

(A) Atividade neutralizante de anticorpos monoclonais anti-hPG

[0227] Os anticorpos monoclonais anti-hPG diminuem a sobrevida celular em linhagens celulares de câncer colorretal representativas. As linhagens celulares de câncer colorretal adequadas são conhecidas na técnica. Por exemplo, HCT116, LS174T, SW480, e SW620 são linhagens celulares comumente usadas para estudar o câncer de cólon, que produzem e secretam a progastrina. Os anticorpos monoclonais para PG foram testados quanto a sua habilidade em inibir a proliferação nessas diferentes linhagens celulares. A sobrevida de células de cada uma de HCT116, LS174T, SW480, e SW620 foi testada usando diferentes anticorpos monoclonais anti-hPG.

[0228] Para cada experimento, 50.000 células foram semeadas em placas de 6 poços em meio que contém soro fetal bovino e incubadas por 8 horas. As células foram privadas de soro por uma noite e, começando 24 horas depois da semeadura (tempo "T0"), as células foram tratadas em duplicatas a cada 12 h por 48 horas, na ausência de

soro fetal bovino, com 1 µg/mL de anticorpos monoclonais de controle (anti-IgG1 humana de camundongo, Calbiochem, Ref #411451) (CT mAb), ou com 1 µg/mL de MAb 1-4 anti-hPG como indicado. Depois da quantificação adicional de anticorpos monoclonais, os anticorpos foram determinados terem sido usados em aproximadamente 3 a 5 µg/mL. O número de células em T0 foi contado em um poço de controle, para cada experimento. Para células HCT116, os experimentos foram conduzidos na presença de 0,5% de soro fetal bovino. 48 horas depois do início do tratamento, o número de células sobreviventes em cada poço foi contado três vezes em um experimento às cegas. A redução na proliferação ou sobrevida de célula de CRC foi determinada pelo cálculo das células tratadas com MAB anti-hPG sobreviventes como um percentual de células tratadas com MAb de controle. As contagens celulares no início do tratamento (T0) foram subtraídas das contagens de teste e de controle medidas em 48 horas. Especificamente, o número de células vivas em ambos os poços tratados com MAb de controle e anti-hPG foi contado com 48 horas, depois a diferença entre cada contagem celular e a contagem celular determinada em T0 foi calculada. O número resultante de células tratadas com MAB anti-hPG foi então expresso como um percentual do número de células tratadas com MAb de controle.

[0229] A FIG. 7A-C mostra o efeito de MAb 3 anti-hPG e MAb 4 anti-hPG sobre a sobrevida de células SW480, células LS174T e células HCT116 de experimentos representativos. Os resultados são a média +/- S.E. de 4 poços originados de dois experimentos independentes. O tratamento com os anticorpos monoclonais anti-hPG reduziu significativamente o número de células comparado com o tratamento com o anticorpo de controle. A significância estatística foi determinada usando um teste T de Student: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, e *** = $p < 0,001$. Em cada linhagem celular, os anticorpos anti-hPG reduziram a

sobrevida celular. Em uma linhagem celular, LS174T, os números celulares no final de 48 horas de tratamento com anticorpos anti-hPG eram menores do que os números celulares no início do experimento, sugerindo que os anticorpos induziram as células a morrer, em adição a inibição da proliferação celular.

[0230] A Tabela 10 mostra o percentual de sobrevida de células de câncer colorretal SW480 tratadas com cada um dos quatro anticorpos monoclonais anti-hPG quando comparados com um anticorpo monoclonal de controle (anti-IgG1 humana de camundongo, Calbiochem, Ref #411451) (CT mAb).

Tabela 10

SW480 (T0 = 26 667)	Números celulares – T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
mAb controle	36050 +/- 3228		
MAb 1 Anti-hPG	30425 +/- 3098	84,4	0,3556
MAb 2 Anti-hPG	28925 +/- 2757	80,2	0,0476
MAb 3 Anti-hPG	6050 +/- 1788	16,8	< 0,0001
MAb 4 Anti-hPG	17560 +/- 3439	48,7	0,0002

[0231] Quando comparado com o controle, o tratamento com anticorpos monoclonais anti-hPG reduz a sobrevida de células de câncer em 83,2% (MAb 3 Anti-hPG), 51,3% (MAb 4 Anti-hPG), 19,8% (MAb 2 Anti-hPG), e 15,6% (MAb 1 Anti-hPG).

[0232] As tabelas abaixo mostram o percentual de sobrevivência de células LS174T e HCT-116 tratadas como MAb 3 e 4 anti-hPG quando comparados com o anticorpo monoclonal de controle. Os dados estão representados graficamente nos painéis correspondentes da FIG. 7.

Tabela 11

HCT-116 (T0 = 42 750)	Números celulares – T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
MAb de controle	151 250 +/- 9071		

Tabela 11

HCT-116 (T0 = 42 750)	Números celulares – T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
MAb3	62 750 +/- 9194	41,5 %	< 0,0001
MAb4	82 250 +/-7435	54,4 %	<0,0001

Tabela 12

LS 174T (T0 = 51 666)	Números celulares – T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
MAb de controle	85 334 +/- 7520		
MAb3	-6666 +/- 5000	- 8 %	0,0084
MAb4	+8334 +/- 2500	7 %	0,0085

[0233] Sob condições de ensaio *in vivo*, a inibição completa do crescimento celular não é esperada. Em cultura celular, a progastrina é continuamente secretada pelas células de câncer e se acumula no meio de cultura celular. Os níveis de progastrina são esperados aumentar ao longo do tempo mais do que ocorreria em circulação no corpo, aumentando a proporção de proteína alvo para anticorpo e diluindo o efeito neutralizante dos anticorpos. Portanto, o efeito neutralizante observado com os anticorpos *in vitro* é esperado ser mais acentuado *in vivo*, onde a progastrina secretada pelas células tumorais é levada pela corrente sanguínea, minimizando seu acúmulo *in situ*.

[0234] A inibição da proliferação celular pelos MAbs 5 a 23 anti-hPG foi determinada em uma ou mais linhagens celulares de CRC SW620, HCT116 e LS47T. Os ensaios foram realizados em placas de 6 poços como descritos acima usando 5 µg/mL de anticorpos monoclonais de controle ou de teste (anti-hPG). 50.000 células foram semeadas por poço para HCT116 e LS174T e 100.000 para células SW620. As tabelas abaixo fornecem o percentual de sobrevivência das células tratadas em relação ao tratamento de controle dos experimentos representativos. Os resultados médios estão representados em gráficos nas FIGs. 7G-I para

as linhagens celulares SW620, LS174T e HCT-116, respectivamente.

Tabela 13

	Número de células -T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
Experimento 1			
SW 620 (T0 = 103 067)			
MAb de controle	82 100 +/- 15489	-	
MAb 5	54 511 +/- 8292	66 %	< 0,0001
MAb 6	44367 +/- 9321	54 %	< 0,0001
MAb 7	49279 +/- 8009	60 %	< 0,0001
MAb 8	32673 +/- 4680	40 %	< 0,0001
MAb 9	73283 +/- 3835	89%	0,1305
MAb 10	70178 +/- 4173	85 %	0,0618
Experimento 2			
SW 620 (T0 = 118 553)			
MAb de controle	81 347 +/- 6062		
MAb 11	46 974 +/- 7422	58 %	0,0003
MAb 12	52 980 +/- 10529	65 %	0,0002
MAb 13	38 933 +/- 5284	48 %	0,0003
MAb 14	83 767 +/- 9484	103 %	0,21
MAb 21	59 497 +/- 2828	73 %	0,0002
MAb 22	64 227 +/- 7123	79 %	0,0013
MAb 23	83 914 +/- 5629	103 %	0,82
Experimento 3			
SW 620 (T0 = 116 283)			
MAb de controle	101 333 +/- 17 626	-	
MAb 15	66 052 +/- 7739	65 %	< 0,0001

Tabela 13

	Número de células -T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
MAb 16	58 883 +/- 9950	58 %	< 0,0001
MAb 17	76 688 +/- 5578	75,5 %	0,0014
MAb 18	75 874 +/- 10129	75 %	0,0005
MAb 19	70 242 +/- 10 851	69 %	< 0,0001
MAb 20	66 470 +/- 7557	66 %	< 0,0001

Tabela 14

	Número de células -T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
Experimento 1			
LS 174T (T0 = 60 944)			
MAb de controle	107 956 +/- 5859		
MAb 13	62 341 +/- 10 683	58 %	0,0003
MAb 16	65 389 +/- 8185	61 %	0,0002
Experimento 2			
LS 174T (T0 = 86 389)			
MAb de controle	241 711 +/- 11 620		
MAb 14	246 444 +/- 19563	102 %	ns
MAb 19	204 433 +/- 8946	84,5 %	0,0005
Experimento 3			
LS 174T (T0 = 79 667)			
MAb de controle	135 800 +/- 18 338		
MAb 8	57 333 +/- 12657	42 %	< 0,001

Table 15

	Número de células - T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
Experimento 1			
HCT-116 (T0 = 49 286)			
MAb de controle	78 214 +/- 6230		
MAb 13	28 805 +/- 3477	36 %	< 0,0001
MAb 16	56 484 +/- 8333	72 %	< 0,0001
MAb 19	68 945 +/- 8795	88 %	0,0302
Experimento 2			
HCT-116 (T0 = 60 944)			
MAb de controle	122 456 +/- 1697		
MAb 8	75 867 +/- 15627	62 %	< 0,0001
MAb 16	87011 +/- 5091	71 %	< 0,0001

(B) Atividade neutralizante de anticorpos policlonais anti-hPG

[0235] Os ensaios foram conduzidos como descrito acima, com as seguintes modificações. Um anticorpo policlonal N-terminal anti-hPG como descrito no Exemplo 5 foi usado. Como controle, 3 µg/mL de anticorpo policlonal (IgG Polyclonal de Coelho anti-humana, Affinity BioReagents, Ref #SA1-600) (CT pAB) foram usadas. Para os tratamentos anti-PG, 3 µg/mL de anticorpo policlonal foram usadas para todas as linhagens celulares. SW480 e LS174T foram tratadas com anticorpos de controle ou policlonal anti-hPG N-terminal por 24 a 48 h em DMEM sem FCS, enquanto que HCT116 foi tratada com anticorpos policlonais anti-hPG por 48 h em DMEM com FCS 0,5%. As células sobreviventes foram tripsinizadas e contadas, em comparação com as células tratadas com uma concentração equivalente de anticorpo policlonal de controle (anti-IgG humana).

[0236] Os resultados dos experimentos representativos são mostrados nas tabelas abaixo e na FIG 7D-F. O tratamento com anticorpos policlonais anti-hPG reduziu significativamente os números celulares quando comparados com o tratamento com o anticorpo de controle. A significância estatística foi determinada usando o teste T de Student: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, e *** = $p < 0,001$. Os números celulares são expressos em relação ao número de células em cultura no início do experimento (T0). Para cada experimento, as células em cada um dos 4 poços foram contadas três vezes. Como com os anticorpos monoclonais anti-hPG, a proliferação de célula de câncer colorretal é inibido pelos anticorpos policlonais anti-hPG, demonstrando que os efeitos anti-tumor vistos com os anticorpos policlonais para a progastrina são razoavelmente preditivos de atividade de anticorpo monoclonal no bloqueio do efeito da progastrina em células de câncer.

Tabela 16

	Número de células -T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
Experimento 1			
SW 480 (T0 = 26 667)			
PAb de controle	37 580 +/- 4233		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	0,0001
Experimento 2			
HCT-116 (T0 = 58 750)			
PAb de controle	105 350 +/- 8660		
PG PAb	7833 +/- 3660	21 %	< 0,05
Experimento 3			
LS174T (T0 = 112 500)	Número de células -T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal

Tabela 16

	Número de células -T0	% de controle	p (Tratada vs Controle)Mann Whitney, bicaudal
PAb de controle	207 500 +/- 10 000		
PG PAb	102 500 +/- 5000	49.5 %	< 0,01

Exemplo 8: Efeito neutralizante de anticorpos monoclonais anti-hPG é eliminado quando os anticorpos são pré-incubados com hPG purificada

[0237] Para demonstrar que o efeito neutralizante dos anticorpos monoclonais anti-hPG é mediado pela ligação a hPG, células LS174T foram cultivadas na presença de um anticorpo exemplificador – Mab 8 anti-hPG – que tinha sido pré-incubado com e sem PG. Como controles positivo e negativo, as células foram cultivadas apenas com hPG, apenas com um anticorpo de controle e o anticorpo de controle pré-incubado com hPG.

[0238] Especificamente, MAb 8 anti-hPG 33,3 nM (5 µg/mL) foi incubado por 1 hora a em temperatura ambiente com um excesso molar de 20 vezes de hPG recombinante ou 667 nM (6,67 µg/mL). A progastrina recombinante humana, preparada como descrito no Exemplo 1, foi usada. Em paralelo, 33,3 nM (5 µg/mL) de anti-IgG1 humana de murino (General BioScience, no. de referência AB23420) foram similarmente pré-incubados com e sem hPG.

[0239] 5000 células LS174T foram semeadas em cada poço de uma placa de 96 poços em meio contendo Soro Fetal bovino 10% e incubadas por 8 horas, depois do que as células foram mudadas para meio sem soro e cultivadas por outras 12 horas. Depois do crescimento em meio sem soro por 12 horas, as células foram tratadas com um dos seguintes a cada doze horas: anticorpo de controle, anticorpo de controle pré-incubado com PG, MAb 8 anti-hPG sozinho, MAb 8 anti-hPG pré-incubado com hPG e apenas hPG. 48 horas depois do primeiro

tratamento, as células viáveis remanescentes foram quantificadas pela incubação das placas com Promega CellTiter 96 Aqueous One Solution e registrando a absorbância a 490 nM. A absorbância medida das células tratadas com o anticorpo monoclonal de controle ("MAb de controle") foi ajustada para 100% e todos as outras condições experimentais medidas contra a absorbância de células tratadas com MAb de controle. Os resultados são mostrados na Tabela abaixo e na FIG. 8.

Tabela 17

	Absorbância	% de controle	p (Tratada vs Controle) Mann Whitney, bicaudal
tratamento só com PG	0,244 +/- 0,088	132,5%	0,099 (n.s.)
MAb de controle	0,184 +/- 0,084	100%	N.A,
MAb 8 Anti-hPG	0,057 +/- 0,06	31%	0,001
MAb de controle +hPG	0,321 +/- 0,079	174,5%	0,002
MAb8 Anti-hPG + hPG	0,271 +/- 0,076	147,6%	0,0229

[0240] A adição ou a incubação de anticorpos com hPG aumenta o número de células em cultura. Em contraste, o tratamento das células com MAb 8 anti-hPG sozinho induz uma redução significativa no número de células viáveis. Portanto, a habilidade de anticorpos monoclonais anti-hPG em neutralizar a atividade de PG é abolida pela adição de hPG, que é considerada se ligar e saturar o anticorpo. Esse resultado confirma a especificidade da atividade neutralizante de anticorpos monoclonais anti-hPG.

Exemplo 9: Atividade anti-tumor *in vivo* de anticorpos anti-hPG

[0241] Vários modelos experimentais *in vivo* têm sido desenvolvidos para o estudo do câncer colorretal. Estudos com xeno-enxerto de camundongo, nos quais tecidos ou células do tumor de linhagens de células de câncer humano são transplantados em camundongo

imunodeficiente (assim chamado de "nu"), têm sido desenvolvidos. Pocard M., *et al.*, *In vivo* (1996) 10(5): 463-469. Vários modelos de camundongo transgênico têm sido desenvolvidos. Modelos de murino incluem mutações heterozigotas no gene da polipose adenomatosa do colo (APC), tais como *Apc^{Min}*, *Apc1638N*, *Apc716*, ou *ApcΔ14*. O gene supressor de tumor APC codifica uma proteína citossólica, APC que, quando intacta, se liga e sequestra a β-catenina no citossol dentro de um complexo de múltiplas proteínas que direcionam a β-catenina para o proteassoma para a degradação, evitando dessa maneira que a β-catenina ative o fator de transcrição Tcf-4 no núcleo. Heyer *et al.*, *Oncogene* 18:5325-5333 (1999). Camundongos APCΔ14 carregam uma deleção heterozigota do exón 14 dentro do gene da *polipose adenomatosa do cólon* (APC). Similar ao que ocorre em mais do que 70% dos pacientes com câncer colorretal esporádico, a perda somática da heterozigocidade (LOH) no segundo alelo de *Apc* ocorre nas células intestinais, levando a uma ativação constitutiva do complexo transcracional β-catenina/Tcf-4 e ao desenvolvimento espontâneo de tumores intestinais nesses animais. A origem molecular desses adenomas e carcinomas, assim como a morfologia do tumor (incluindo a vascularização, a resposta inflamatória e a presença de células imunes) com similaridade muito maior àquela de tumores humanos comparados com modelos de xeno-enxerto em camundongo, torna APCΔ14 um modelo altamente relevante para estudos de terapia de câncer colorretal humano. Colnot *et al.*, 2004, *Lab. Invest.* 84:1619-1630. Outros modelos de camundongo transgênico são baseados em mutações de genes tais como MSH2, MSH6, CDX2, K-RAS, assim como as linhagens que combinam mutações em APC com mutações em outros oncogenes. Heyer *et al.*, 1999, *Oncogene* 18:5325-5333, Janssen KP *et al.*, 2002, *Gastroenterology* 123: 492-504. Esses modelos são amplamente

usados para estudar o câncer colorretal e as hipóteses de teste com relação ao tratamento do câncer colorretal.

[0242] Camundongos transgênicos que carregam uma deleção heterozigota do éxon 14 com o gene da *polipose adenomatosa do colo* (*APCΔ14*) serve como um modelo para o câncer colorretal, desenvolvendo tumores similares aqueles encontrados em cânceres de cólon humano. Em um primeiro experimento, camundongos *APCΔ14* foram tratados com uma preparação contendo quantidades iguais de anticorpos policlonais anti-hPG originados contra (1) um peptídeo que corresponde a SEQ ID NO: 25 e (2) um peptídeo C-terminal como descrito em Hollande *et al.*, WO 07/135542. Camundongos com 3,5 meses de idade foram tratados por 5 semanas com um anticorpo policlonal de controle ou anticorpo policlonal anti-hPG (dois camundongos por tratamento). Os anticorpos foram administrados por injeção intraperitoneal duas vezes por semana em uma dose de 10 mg/kg (150 µl de volume de injeção). No final do tratamento, os camundongos foram sacrificados e os intestinos foram lavados com PBS, dissecados para imagem digital e fixados em para-formaldeído 4% para análise histoquímica. O número e as imagens do tumor de tecido colorretal foram registrados.

[0243] A avaliação morfológica do tecido intestinal mostrou que os anticorpos anti-hPG não afetam a renovação do epitélio intestinal saudável de murino. Os tumores foram contados nos grupos de tratamento e de controle. O número total de tumores dos camundongos tratados com anticorpos de controle foi de 27, quando comparado com 4 nos camundongos tratados com anticorpos anti-hPG. Portanto, os anticorpos anti-hPG reduzem a contagem de tumor em mais do que 6,5 vezes quando comparados com os anticorpos de controle enquanto não afetam a renovação do epitélio saudável no intestino do camundongo.

[0244] Em um segundo experimento, o efeito dos anticorpos anti-hPG em camundongos APCΔ14 e em camundongos normais (de controle) (C57BL6J) foi examinado. Camundongos com 4 meses de idade foram tratados duas vezes por semana por 6 semanas com anticorpo policlonal de controle – soro de coelho anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch (no. de referência 309-005-0089)– ou anticorpo policlonal anti-hPG, por injeção intraperitoneal duas vezes por semana em uma dose de 9 mg/kg (150 µl de volume de injeção). Depois de seis semanas de tratamento, duas horas antes do sacrifício, os camundongos foram inoculados com Bromo-desoxi-uridina (BrdU) (2 mg por camundongo, injeção intraperitoneal). 6 camundongos APCΔ14 foram tratados com anticorpo policlonal anti-hPG e 4 com anticorpos policlonais de controle. Nenhuma anormalidade intestinal foi detectada em qualquer um dos camundongos de qualquer grupo, demonstrando adicionalmente a segurança e a ausência de efeitos adversos de anticorpos anti-hPG sobre o tecido intestinal normal.

[0245] Os números e o tamanho do tumor (altura e comprimento) foram examinados em grupos tratados versus de controle de camundongos APCΔ14. O tamanho do tumor foi determinado pelas medidas das imagens tiradas dos intestinos de cada animal, preparadas como a seguir. Os intestinos foram lavados como descrito acima, dissecados longitudinalmente, embebidos em parafina e processados para a imuno-histoquímica usando a técnica "Swiss roll". As medidas do cumprimento e altura do tumor foram realizadas usando o programa Image J.

[0246] Os resultados são mostrados na Tabela 18 e na FIG 8A e B. Os resultados do tamanho do tumor mostram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com controle e tratados com hPG. A significância estatística foi determinada usando um teste de Mann Whitney: * = p<0,05, ** = p<0,01, e *** = p<0,001. Camundongos tratados com o anticorpo de controle exibiram um total

de 125 tumores, com média de 31,25 tumores por camundongo. Camundongos tratados com anti-hPG exibiram 46 tumores ou uma média de 7,6 tumores por camundongo. Essa diferença é estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney, $P = 0,0095$) mostrando que os anticorpos anti-hPG reduzem significativamente o número de tumores de câncer colorretal *in vivo*.

Tabela 18

Tratamento (no. de camundongos)	Número de tumores por camundongo					
PAb de controle (4)	23	48	28		26	
PAb Anti-hPG (6)	2	16	15	9	2	2

[0247] Os anticorpos anti-hPG reduzem significativamente os tumores de câncer colorretal *in vivo* como medido pela redução do número de tumores e no tamanho do tumor em um modelo de murino de câncer colorretal, sem qualquer efeito adverso aparente sobre o epitélio colorretal normal. Portanto, o tratamento de tumores de câncer colorretal com anti-hPG fornece um benefício terapêutico *in vivo*.

Exemplo 10: Modelagem de anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados

[0248] Os anticorpos humanizados foram modelados "in silico" a partir dos anticorpos monoclonais anti-hPG de murino MAbs 3, 4, 8, 13, 16 e 19. O desenho de anticorpos humanizados foi realizado de acordo com a metodologia descrita em Lefranc *et al.*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77; Lefranc *et al.*, 2009, Nucl. Acids Res. 37: D1006-1012; Lefranc, 2008, Mol. Biotechnol. 40: 101-111. Para cada anticorpo monoclonal de murino, as sequências de peptídeo de V_H e V_L humanizadas correspondentes foram determinadas por: identificação da CDR e das regiões estruturais nas sequências de murino usando o banco de dados IMGT-ONTOLOGY (Duroux *et al.*, 2008, Biochimie, 90:570-583; Giudicelli and Lefranc, 1999, Bioinformatics, 15: 1047-1054) and IMGT® databases and tools (Ehrenmann *et al.*, 2010, Nucl.Acids. Res.,

38: D301-307; Brochet *et al.*, 2008, Nucl.Acids. Res., 36: W503-508), seguido pela identificação da sequência de aminoácidos das sequências da região estrutural humana mais próxima no IMGT/GENE-DB (Giudicelli *et al.*, 2005, Nucl.Acids. Res., 33: D256-261) e enxerto das sequências de CDR de murino nas regiões estruturais humanas. Mais particularmente, as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos domínios V_H e V_L de murino foram analisadas usando IMGT/V-QUEST e IMGT/ DomainGapAlign para delimitar as CDRs de murino e as regiões estruturais, definir as extensões da CDR e identificar ancoras de aminoácidos. Ancoras de aminoácidos são resíduos na posição 26, 39, 55, 66, 104 e 118 de IMGT "Collier de Perles" que suportam as CDR1-IMGT, CDR2-IMGT, CDR3-IMGT (Kaas and Lefranc, 2007, Current Bioinformatics, 2: 21-30; Kaas *et al.*, Brief. Funct. Genomic Proteomic, 2007, 6: 253-264). Os genes V humano (variável) e J (de ligação) mais próximos das sequências de murino foram identificados e os genes mais adequados escolhidos. Aminoácidos individuais na região estrutural de murino eram mantidos se eles fossem considerados contribuir possivelmente para a especificidade do anticorpo em comparação com estruturas 3D conhecidas (Kaas *et al.*, 2004, Nucl. Acids. Res. 32: 208-210) usando IMGT Collier de Perles sobre duas camadas.

[0249] CDRs de V_H para MAb 3 foram determinadas ter 8, 8, e 8 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo da sequência de V_H de MAb 3, IGHV1-5*01, diferia em 10 resíduos, 3 dos quais foram mapeados para as CDRs e foram mantidos no modelo dos anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados (I29 em CDR1, F56 e S65 em CDR2). Adicionalmente, V39, G55 e R66 foram considerados potencialmente importantes para preservar a especificidade e foram mantidos no modelo. O gene da linhagem germinativa humana mais próximo era IGHV1-3*01 (63,3% idêntico à

nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 27 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, a Treonina-123 e Leucina-124 foram substituídos por Leucina-123 e Valina-124, de modo a combinar com o gene IGHJ1*01 humano. De modo geral, a V_H humanizada para MAb 3 é 87,8% idêntica à região variável de IGHV1-46*03 e 88 dos 91 aminoácidos nas quatro regiões estruturais são idênticos.

[0250] CDRs de V_L para MAb 3 foram determinadas ter 11, 3, e 9 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo com a sequência de V_L de MAb 3, IGKV1-117*01, diferiu em um único resíduo mapeando uma região estrutural. O gene da linhagem germinativa humana mais próximo era IGKV2-30*02 (81% idêntico à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 14 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, a Serina-120 foi substituída por Glutamina-120, de modo a combinar com o gene IGKJ2*01 humano. De modo geral, a sequência V_K humanizada para MAb 3 é 93% idêntica IGKV2D-49*02 e 87 dos 89 aminoácidos nas quatro regiões estruturais são idênticos.

[0251] As sequências projetadas de V_H e V_K são fornecidas na tabela abaixo.

Tabela 19

SEQ NO:	ID	Sequência de aminoácidos	cadeia V
21		QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYIFTSYWVHWVRQAP GQRLEWMGGFYPGNSDSRYSQKFQGRVTITRDTASTAYMEL SSLRSEDTAVYYCTRRDSPQYWGQGTLTVSS	hVH3

Tabela 19

SEQ NO:	ID	Sequência de aminoácidos	cadeia V
22		DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQ QRPGQSPRRLIYKVSNRFSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCFQGSHVPFTFGGGTKVEIK	hV κ 3

[0252] CDRs de V_H para MAb 4 foram determinadas ter 8, 8, e 11 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo da sequência de V_H de MAb 4, IGHV1-9*01, diferia em 11 resíduos, 4 dos quais foram mapeados para as CDRs e foram mantidos no modelo dos anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados (S35, S36 e S37 em CDR1, F56 em CDR2). Adicionalmente, D66 foi considerado potencialmente importante para preservar a especificidade e foi mantido no modelo. O gene da linhagem germinativa humana mais próximo era IGHV1-46*03 (64,9% idêntico à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 27 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, Alanina-128 foi substituída por Serina-128, de modo a combinar com o geneIGHJ5*01 humano. De modo geral, a V_H humanizada para MAb 4 é 91,8% idêntica à região variável de IGHV1-46*03 e 90 dos 91 aminoácidos nas quatro regiões estruturais são idênticos.

[0253] CDRs de V_L para MAb 4 foram determinadas ter 11, 3, e 9 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo com a sequência de V_L de MAb 4, IGKV1-110*01, diferiu em 3 resíduos, 2 dos quais foram mapeados na CDR1 (Serina-34 e Valina-36) e foram mantidos no desenho dos anticorpos monoclonais humanizados anti-

hPG. O gene da linhagem germinativa humana mais próximo era IGKV2-29*02 (81% idêntico à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 11 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Os resíduos E40 e F68 foram mantidos na sequência humanizada projetada. Na região estrutural 4, a Serina-120 foi substituída por Glutamina-120, de modo a combinar com o gene IGKJ2*01 humano. De modo geral, a sequência V_{κ} humanizada para MAb 4 é 92% idêntica IGKV2D-29*02 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0254] As sequências projetadas de V_H e V_{κ} são fornecidas na tabela abaixo.

Tabela 20

SEQ ID NO:	Sequência de aminoácidos	cadeia V
23	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFSSSSWMHWVRQAPG QGLEWMGIFLPGSGSTDYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELS SLRSEDTAVYYCATDGNYDWFAYWGQQGTLTVSS	hVH4
24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASICKSSQLVHSSGVTYLYWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQQGKLEIK	hV κ 4

[0255] CDRs de V_H para MAb 8 foram determinadas ter 8, 8, e 10 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo da sequência de V_H de MAb 8, IGHV5-9-3*01, diferia em 5 resíduos, 4 dos quais foram mapeados para as CDRs e foram mantidos no modelo dos anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados. Os genes da linhagem germinativa humana mais próximos eram IGHV3-21*01 e *02 (80,4% idênticos à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 12 diferenças na

sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, Serina-123 e Leucina-124 foram substituídas por Treonina-123 e Valina-124, de modo a combinar com o gene IGHJ6*01 humano. De modo geral, a V_H humanizada para MAb 8 é 92,8% idêntica à região variável de IGHV3-21*01 e *02 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0256] CDRs de V_L para MAb 8 foram determinadas ter 11, 3, e 9 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo com a sequência de V_L de MAb 8, IGKV2-109*01, diferiu em 6 resíduos, 4 dos quais foram mapeados na CDR1 e foram mantidos no desenho dos anticorpos monoclonais humanizados anti-hPG. Os genes da linhagem germinativa humana mais próximos eram IGKV2-28*01 e IGKV2D-28*01 (75% idênticos à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 12 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, a Alanina-120, Leucina-124 e Leucina-126 foram substituídas por Glicina-120, Valina-124 e Isoleucina-126, respectivamente, de modo a combinar c4m o gene IGKJ2*01 humano. De modo geral, a sequência V_K humanizada para MAb 8 é 87% idêntica a IGKV2D-28*01 e IGKV2D-28*01 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0257] As sequências projetadas de V_H e V_K são fornecidas na tabela abaixo.

Tabela 21

SEQ ID NO:	Sequência de aminoácidos	cadeia V
75	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFT FTTYAMNWVRQAPGKGLEWVSSISGGT YTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQGTT VTVSS	hVH8a

Tabela 21

SEQ ID NO:	Sequência de aminoácidos	cadeia V
76	DIVMTQSPLSLPVTPGEPA SISCRSSKSLRHTKGITFLD WYLQKPGQSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPLTFGGGTKEIK	hV κ 8a
77	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVS SISSGGTYTYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCATQGNYSLDFWGQQGTTVTVSS	hVH8b
78	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSKSLRHTKGITFLYWYLQKPG QSPQLLIYQMSNRASGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCAQNLELPLTFGGGTKEIK	hV κ 8b
79	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFTTYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISSG GTYTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCATQGNYSLDFWGQQGTTVTVSS	hVH8b

[0258] CDRs de V_H para MAb 13 foram determinadas ter 8, 8, e 7 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo da sequência de V_H de MAb 13, IGHV5-6-3*01, diferia em 10 resíduos, 5 dos quais foram mapeados para as CDRs e foram mantidos no modelo dos anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados. Os genes da linhagem germinativa humana mais próximos eram IGHV3-7*01 e *02 (78,6% idênticos à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 13 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes

da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, Treonina-123 e Leucina-124 foram substituídas por Leucina-123 e Valina-124, de modo a combinar com o gene IGHJ4*01 humano. De modo geral, a V_H humanizada para MAb 13 é 91,8% idêntica à região variável de IGHV3-7*01 e *02 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0259] CDRs de V_L para MAb 13 foram determinadas ter 11, 3, e 9 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo com a sequência de V_L de MAb 13, IGKV1-135*01, diferiu em um único resíduo, localizado na região estrutural. Os genes da linhagem germinativa humana mais próximos eram IGKV2-30*01 e *02 (81% idênticos à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 13 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, Leucina-124 foi substituída por Valina-124, de modo a combinar com o gene IGKJ4*01 humano. De modo geral, a sequência V_K humanizada para MAb 13 é 94% idêntica a IGKV2-30*01 e *02 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0260] As sequências projetadas de V_H e V_K são fornecidas na tabela abaixo.

Tabela 22

SEQ NO:	ID Sequência de aminoácidos	cadeia V
80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FSSYGM SWVRQAP GKGLEWVANINTFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGTGTW GQGTLTVSS	hVH.13a
81	DV VMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLNWFQ QRPGQSPRRLIYLVSNRD SGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC WQGTHFPQT FGGGT KVEIK	hV κ 13a

Tabela 22

SEQ NO:	ID	Sequência de aminoácidos	cadeia V
82		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FSSYGMSWVRQ APGKGLEWVASINTFGDRTYYVDSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGTWQGQTLTVSS	hVH13b
83		DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLNW FQQRPGQSPRRLIYLVSKRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGYYCWQGTHFPQTFGGGTKVEIK	hV _k 13b

[0261] CDRs de V_H para MAb 16 foram determinadas ter 8, 8, e 10 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo da sequência de V_H de MAb 16 de murino, IGHV1-53*01, diferia em 7 resíduos, 2 dos quais foram mapeados para as CDRs e foram mantidos no modelo dos anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados. Os genes da linhagem germinativa humana mais próximos eram IGHV1-46*01 e*03 (71,4% idênticos à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 25 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, Leucina-124 foi substituída por Valina-124, de modo a combinar com o geneIGHJ6*01 humano. De modo geral, a V_H humanizada para MAb 16 é 96,9% idêntica à região variável de IGHV1-46*01 *03 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0262] CDRs de V_L para MAb 16 foram determinadas ter 11, 3, e 9 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo com a sequência de V_L de MAb 16 de murino, IGKV1-135*01, diferiu em 4 resíduos localizados na região estrutural. Os genes da linhagem germinativa humana mais próximo eram IGKV2-30*01 e *03 (79% idênticos à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign) que diferiam em um

aminoácido na CDR1. 15 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, a Glicina-120 foi substituída por Glutamina-120, de modo a combinar com o gene IGKJ2*01 humano. De modo geral, a sequência V_k humanizada para MAb 1 é 94% idêntica IGKV2D-30*01 e *02 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0263] As sequências projetadas de V_H e V_k são fornecidas na tabela abaixo.

Tabela 23

SEQ ID NO:	Sequência de aminoácidos	cadeia V
84	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPG QGLEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELOSS LRSEDTAVYYCTRGYYYPFDYWGQGTTVTVSS	hVH16a
85	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLNWFQQ RPGQSPRRLIYLVSNRDGSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHSPYTFGQGTTKLEIK	hV κ 16a
86	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQG LEWMGIINPSNGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELOSSLRSE DTAVYYCTRGYYYPFDYWGQGTTVTVSS	hVH16b
87	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLYWFQQRP GQSPRRLIYLVSNRDGSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHSPYTFGQGTTKLEIK	hV κ 16b
88	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMYWVRQAPGQGL EWMGEINPSNGGNTYAQKFQGRVTMTRDTSTVYMELOSSLRSED TAVYYCTRGYYYPFDYWGQGTTVTVSS	hVH16c
89	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLSDGKTYLYWFQQRP GQSPRRLIYLVSERDGSVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHSPYTFGQGTTKLEIK	hV κ 16c

[0264] CDRs de V_H para MAb 19 foram determinadas ter 9, 7, e 14

aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo da sequência de V_H de MAb 19, IGHV3-2*01, diferia em 5 resíduos, 2 dos quais foram mapeados para as CDRs e foram mantidos no modelo dos anticorpos monoclonais anti-hPG humanizados. O gene da linhagem germinativa humana mais próximo era IGHV4-30-4*01 (72,4% idêntico à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). Entretanto, como esse gene é polimórfico, IGHV4-31*02 e *03 (71,4% idênticos a nível de aminoácidos baseado em IGMT/DomainGapAlign) foram selecionados. 21 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, Isoleucina-123 foram substituídas por Leucina-123, de modo a combinar com o gene IGHJ4*01 humano. De modo geral, a V_H humanizada para MAb 19 é 91,9% idêntica à região variável de IGHV4-31*02 e *03 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0265] CDRs de V_L para MAb 19 foram determinadas ter 7, 7, e 13 aminoácidos de extensão para as CDR 1, 2 e 3 respectivamente. O gene da linhagem germinativa de camundongo mais próximo com a sequência de V_L de MAb 19, IGLV3*01 diferiu em 8 resíduos, 5 dos quais localizados em uma CDR. Os genes da linhagem germinativa humana mais próximos eram IGLV4-69*01 e *02 (69,9% idênticos à nível de aminoácido baseado no IGMT/DomainGapAlign). 23 diferenças na sequência das regiões estruturais 1 a 3 foram encontradas entre os genes da linhagem germinativa de murino e humana. Na região estrutural 4, Valina-124 foi substituída por Leucina-124, de modo a combinar com o gene IGLJ3*01 humano. Alternativamente, o gene IGJK4*01 pode ser usado na região estrutural 4. De modo geral, a sequência V_k humanizada para MAb 19 é 92,4% idêntica a IGLV4-69*01 e *02 e 100% idêntica nas quatro regiões estruturais.

[0266] As sequências projetadas de V_H e V_k são fornecidas na

tabela abaixo.

Tabela 24			
SEQ NO:	ID	Sequência de aminoácidos	cadeia V
90		QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITS DYAWSWIRQH PGKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLTVSS	VH19a
91		QLVLTQSPSASASLGASVKTLC TLSSQHRTYTI AWHQQQPEK GPRYLMKVKKDGS HS KGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSE DEADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	Vk19a
92		QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITS DYAWN WIRQHP GKGLEWIGYISFSGYTYYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLKLSS VTAADTA VYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLTVSS	VH19b
93		QLVLTQSPSASASLGASVKTLC TLSSQHRTYTI EWHQQQPEKG PRYLMKVKKDGS HS KGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSED EADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	Vk19b
94		QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITS DYAWN WIRQHPGK GLEWIGYISFSGYTSYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLKLSSVTA ADTA VYYCAREVNYGDSYHFDYWGQGTLTVSS	VH19c
95		QLVLTQSPSASASLGASVKTLC TLSSQHRTYTI EWHQQQPEKGP RYLM EVKKDGS HS KGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISSLQSEDE ADYYCGVGDAIKGQSVFVFGGGTKVEIK	Vk19c

[0267] Todas as publicações, patentes, pedidos de patente e outros documentos citados nesse pedido estão incorporados por referência em sua totalidade para todos os propósitos na mesma extensão como se cada publicação individual, patente, pedido de patente e outros documentos estivessem indicados individualmente para serem incorporados pela referência para todos os propósitos. Embora várias modalidades específicas tenham sido ilustradas e descritas, será apreciado que várias alterações podem ser feitas sem se afastar do espírito e escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal anti-hPG que se liga especificamente a uma região C-terminal de progastrina humana (hPG), caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes CDRs V_H e V_L :

CDR1 V_H de SEQ ID NO: 37, CDR2 V_H de SEQ ID NO: 41, CDR3 V_H de SEQ ID NO: 45, CDR1 V_L de SEQ ID NO: 49, CDR2 V_L de SEQ ID NO: 52 e CDR3 V_L da SEQ ID NO: 55.

2. Anticorpo monoclonal anti-hPG de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que produz uma redução estatisticamente significativa no número de células de câncer colorretal vivas após o tratamento *in vitro* de uma amostra teste em comparação com uma amostra controle tratada com um anticorpo monoclonal não específico.

3. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as referidas células de câncer colorretal são células LS174T.

4. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre o grupo consistindo em: anticorpos quimérico, primatizado e humanizado

5. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende cadeias V_H e V_L apresentando sequências representadas por SEQ ID NO: 59 e SEQ ID NO: 63, respectivamente.

6. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que é humanizado.

7. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende cadeias V_H e V_L que apresentam sequências selecionadas de um dos seguintes grupos de sequências de V_H e V_L :

- (i) V_H de SEQ ID NO: 75 e V_L de SEQ ID NO: 76;
- (ii) V_H de SEQ ID NO: 77 e V_L de SEQ ID NO: 78; e
- (iii) V_H de SEQ ID NO: 79 e V_L de SEQ ID NO: 76.

8. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que tem uma afinidade na faixa de 1 pM a 7 nM.

9. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que está conjugado a uma porção.

10. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo monoclonal como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e um excipiente, veículo e/ou diluente.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que é formulada para uso farmacêutico.

12. Anticorpo monoclonal anti-hPG, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de câncer colorretal.

13. Anticorpo monoclonal anti-hPG, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o tratamento do câncer colorretal envolve a administração do referido anticorpo em combinação com um segundo agente terapêutico.

14. Anticorpo monoclonal anti-hPG, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo e o referido segundo agente terapêutico são administrados simultaneamente, sucessivamente ou separadamente.

15. Anticorpo monoclonal anti-hPG, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o referido segundo agente terapêutico é um agente quimioterápico ou um anticorpo terapêutico.

16. Anticorpo monoclonal anti-hPG, de acordo com a

reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o referido segundo anticorpo terapêutico é um anticorpo monoclonal anti-EGFR ou um anticorpo monoclonal anti-VEGF.

17. Uso de um anticorpo monoclonal anti-hPG, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que é para o preparo de uma composição ou formulação para tratar câncer colorretal.

FIG. 1

Preprogastrina:

M QRLCVYVLF ALAIAAFSEA SWKPRSQQPD APLGTGANRD LELPWLEQQG
 -21 -11 -1 1 21
PASHHRRQLG **PQGPPHLVAD** **PSKKQGPWLE** **EEEAYGMD** **FGRRSAEDEN**
 31 41 51 61 71

Progastrina:

PASHHRRQLG **PQGPPHLVAD** **PSKKQGPWLE** **EEEAYGMD** **FGRRSAEDEN**
 31 41 51 61 71

G34 :

QLG **PQGPPHLVAD** **PSKKEGPWLE** **EEEAYGMD** **F-NH₂**
 41 51 61 71

G34-Gly:

QLG **PQGPPHLVAD** **PSKKEGPWLE** **EEEAYGMD** **FG**
 41 51 61 71

G17 :

EGPWLE **EEEAYGMD** **F-NH₂**
 61 71

G17-Gly:

EGPWLE **EEEAYGMD** **FG**
 61 71

CTFP:

SAEDEN
 75

FIG. 2A

2/33

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTTCAAGCTCCAGCAGTCAGTCTGGGACTGTGCTGGCTGGGCCAAGGCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACATCTTACCGCTACTGGG
 E V L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y I F T S Y W

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TACACTGGTTAACACAGGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTTTATCCTGAAATAGTGATTCTAGGTACACCCAGAAATTCAAGGGCAA
 V H W V K Q R P G Q L E W I G F Y P G N S D R Y N Q K F K G K

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GCCCACACTGACTGGAGTCACATCCGCCAGTACTGCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGGGTCTATTTCTGTACAAGGAAGAGAT
 A T L T A V T S A S T A Y M D L S S L T N E D S A V Y F C T R R D

 310 320 330 340
 AGTCCCCAAGTACTGGGGCCAAGGCCACACTCTCACAGTCTCCTCA
 S P Q Y W G Q G T T L T V S S

 mV_HCDR 3.3

FIG. 2B

3/33

GATGTTTGTGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGCTGTCAAGCCTCCATCTTGAGATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTTGACATAGTAATG
 D V L M T Q T P L S L P V S L P G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N

 mV_LCDR 1.3

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAAACACCTATTAGAATGGTACCTGCAGAAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATTCTGGGTTCTGGGAGACAGGTT
 G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F

 mV_LCDR 1.3

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTACACTCAAAGATCAGCAGACTGGAGGCTGAGGGATCTGGGACTTACTGCTTCAAGGTTCACATGTTCCG
 S G S G S G T D F T L K I S R L E A E D L G V Y C F Q G S H V P

 mV_LCDR 2.3

310 320 330
 TTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
 F T F G G T K L E I K

 mV_LCDR 3.3

FIG. 2C

4/33

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 CAGGTTCA GTTG CAGC AGCT GTGG AGCT GAGCT GATGAAGC CAGGG CCTCAGT GAAGATA TCCCT GCAAGG CTACTGG CTACACATT CAGTAG CTCCT GGA
 Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K A T G Y T F S S W

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TAGAGTGGTTAAAACAGAGGGCCTGGACATGGCCCTTGAGTGGATTGGAGAGTTTACCTGGAAAGTGGTAGTACAGACTACAAATGAGAAAGTTCAAGGGCAA
 I E W L K Q R P G H G L E W I G E F L P G S G S T D Y N E K F K G K

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 GGCCACATTCACTGCAGACACATCCTCCGACACAGCCTACATGCTACTCAGCAGGCCTGACATCTGAGGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAACTSATGGT
 A T F T A D T S S D T A Y M L L S S L T S E D S A V Y Y C A T D G

 310 320 330 340 350
 AATTATGACTGGTTTGTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
 N Y D W F A Y W G Q G T L V T V S A

 mV_HCDR 3.4

FIG. 2D

5/33

FIG. 2E

6/33

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAA GTG CAG CTG GTG GG AGT CTG GGG GCT TAG TGA AGC CTT GGG CCT CTG GAG CCT CACT ACC TT CACT ACC TT GCCA
 E V Q L V E S G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F T T Y A

 mV_HCDR 1.8

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGT CTT GGG TT CGCC AGACT CCG GAG AA AGGG CT GGAG GT GGCT CGCA ACC ATT AGTAG TGT GGT ACT TT ACAC TCT ACTA T
 M S W V R Q T P E K R L E W V A T I S S G G T Y T Y P D S V K G R

 mV_HCDR 2.8

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATT CACCA TCT CCAG AGACA ATGCC AAGAAC CGCC CTATA CCT GCA AAATGAGC AGT CTG AGGG CT GAGG ACAC GGCC ATGT ATT ACT GTC
 F T I S R D N A K N A L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A T Q G

 mV_HCDR 3.8

310 320 330 340
 ATT ACT CTT GGACT TTCT GGG GCAAGG CACCT CTCT CACAGT CT CCT CA
 N Y S L D F W G Q G T S L T V S S

 mV_HCDR 3.8

FIG. 2F

7/33

FIG. 2G

8/33

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GAGGTGAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGCTGGAGGGCTGGCAGCCTGGAAACTCTCCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCA
 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F I F S S Y G

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 TGTCTTGGTTGCCAGTCTCCAGACAGGGCTGGAGTTGGTCAAGTATTAACTTGGTGGTGAACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCG
 M S W V R Q S P D R R L E L V A S I N T F G D R T Y Y P D S V K G R

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ATTCAACATCTCCAGAGACAAATGCCAACACCTGTACCTGCAAATGACCAAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATTATTACTGTGCAAGAGGGACC
 F T I S R D N A K N T L Y L Q M T S L K S E D T A I Y Y C A R G T

 310 320 330 340
 GGAAACCTAATGGGGCCAAGGCCAACACTCTCACAGTCTCCCTCA
 G T Y W G Q G T T L V S S

 mV_HCDR 3.13

FIG. 2H

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTTGCTGACTCCACTCACTTGTGGTAAACATTGGACAACCAAGCCTCCATCTCCTGCAAGTCAGAGCCTCTAGATAGTGTGATG
 D V V L T P L T S V T I G Q P A S I S C K S S Q S L I D S D

 mV_L CDR 1.13

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GAAAGACATATTGAAATTGGTTACAGGGCCAGGCCCCAGTCTCCAAAGGCCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGGCTGCACAGGTT
 G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V P D R F

 mV_L CDR 2.13

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGAGTTATTGCTGGCAAGGTACACATTTCCCT
 T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y C W Q G T H F P

 mV_L CDR 3.13

310 320 330
 CAGACGTTGGGGAGGCCAACCAAGCTGGAAATCAA
 Q T F G G T K L E I K

 mV_L CDR 3.13

FIG. 2|

10/33

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
CAGGTCCA ACTGCAGTCTGGGCTGA ACTGGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCCTGCAAGGGCTTCTGGCTACACCTCACCCAGCTACTATA
Q V L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y Y

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
TGTACTGGGTGAAGGAGAGGGCCTGGGACAAGGCCCTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAATGGTACTAACTTCAATGAGAAAGTCAAGAGCAA
M Y W V K Q R P G Q L E W I G E I N P S N G G T N F N E K F K S K

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
GGCCACACTGACTGGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCATAATGCAACTCAGCACCCCTGACATCTGAGGACTCTGGGGTCTATTACTGTACAAGAGGGGT
A T L T V D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y C T R G G

310 320 330 340 350
TACTACCCCTTTGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCCTCA
Y Y P F D Y W G Q G T T L T V S S

mV_HCDR 1.16
mV_HCDR 2.16
mV_HCDR 3.16

FIG. 2J

11/33

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

FIG. 2K

12/33

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 GATGTGAGCTTCAGGGAGTGGGACCTGGCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGCACATGCACACTGGCTACTCAATCACCGTGAATTG
 D V L Q E S G P G L V K P S Q L T C T V T G Y S I T S D Y

 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 CCTGGAAATTGGATCCGGCAGTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGCTACATAAGCTTCAGTGGTTACACTAGTTACAACCCATCTCAAAGTCG
 A W N W I R Q F P G N K L E W M G Y I S F S G Y T S Y N P S L K S R

 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 AATCTCTGTCACTCGGACACATCCAGGAACCAATTCTCCAGTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGGGTC
 I S V T R D T S R N Q F F L Q L T S V T T E D T A T Y Y C A R E V

 310 320 330 340 350 360
 AACTATGGGGACTCCTACCACTTGAACACTGGGGCCAAGGCACCATGTGACAGTCTCCCTCA
 N Y G D S Y H F D Y W G Q G T I V T V S S

 mV_HCDR 3.19

FIG. 2L

13/33

FIG. 3A

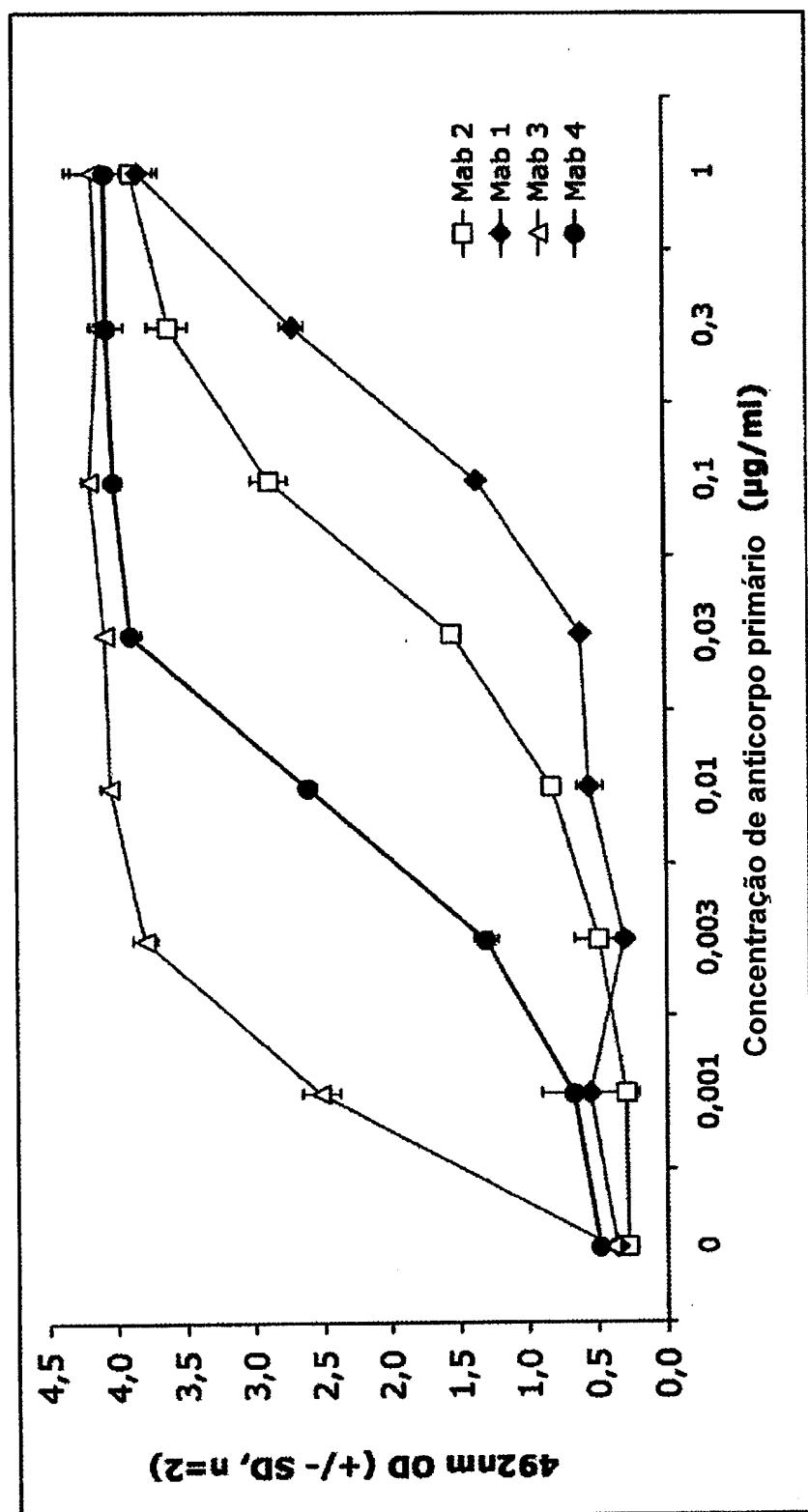


FIG. 3B

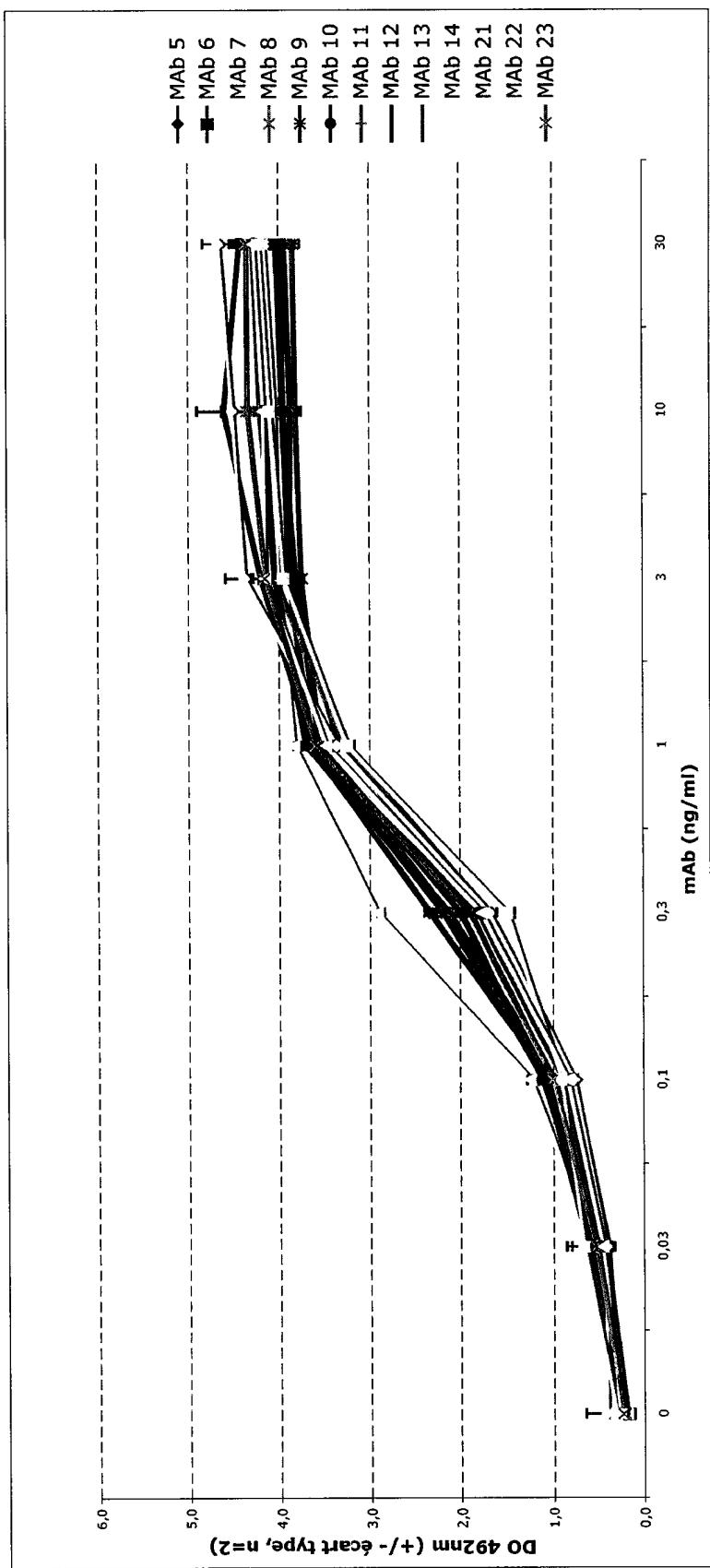


FIG. 3C

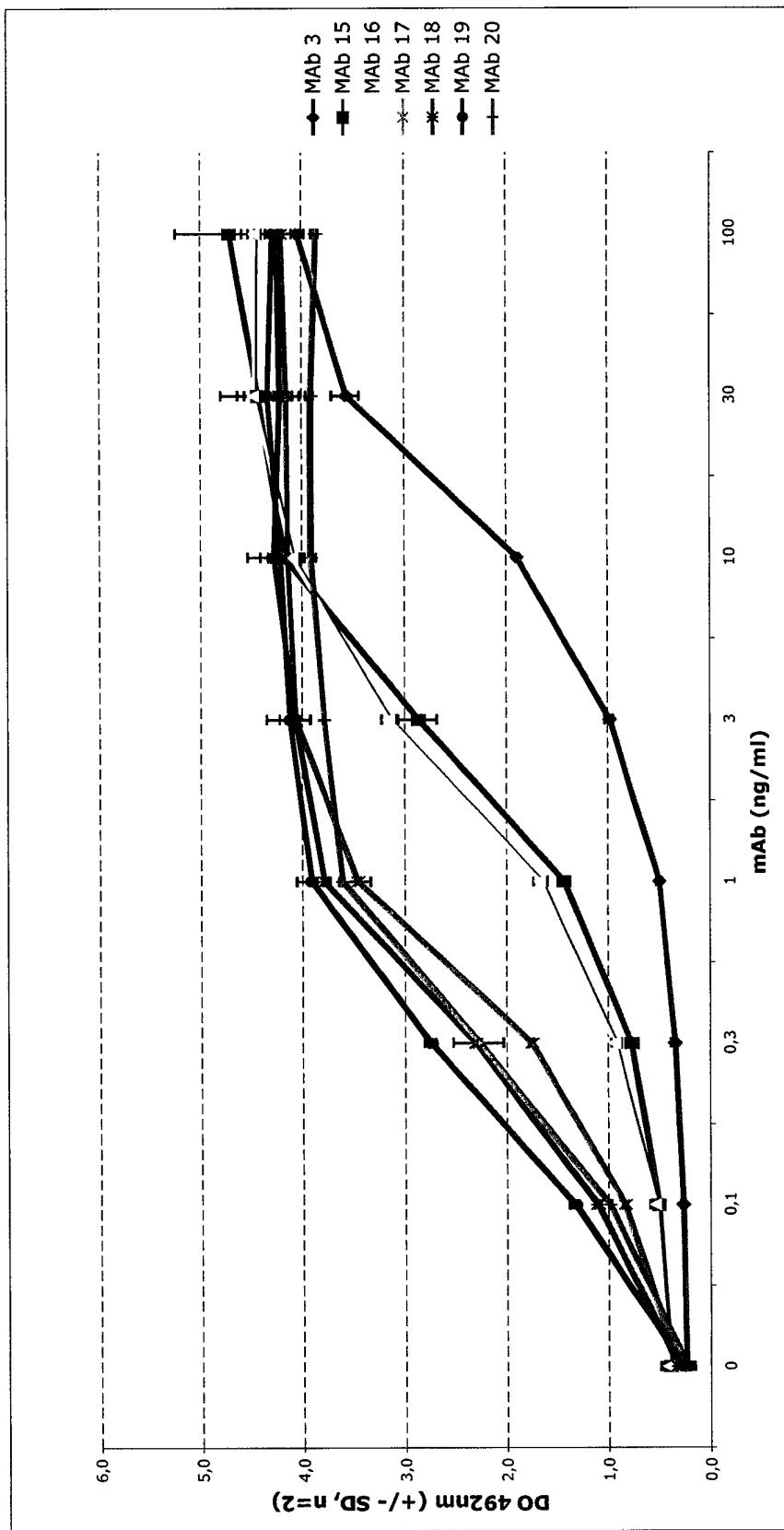


FIG. 4

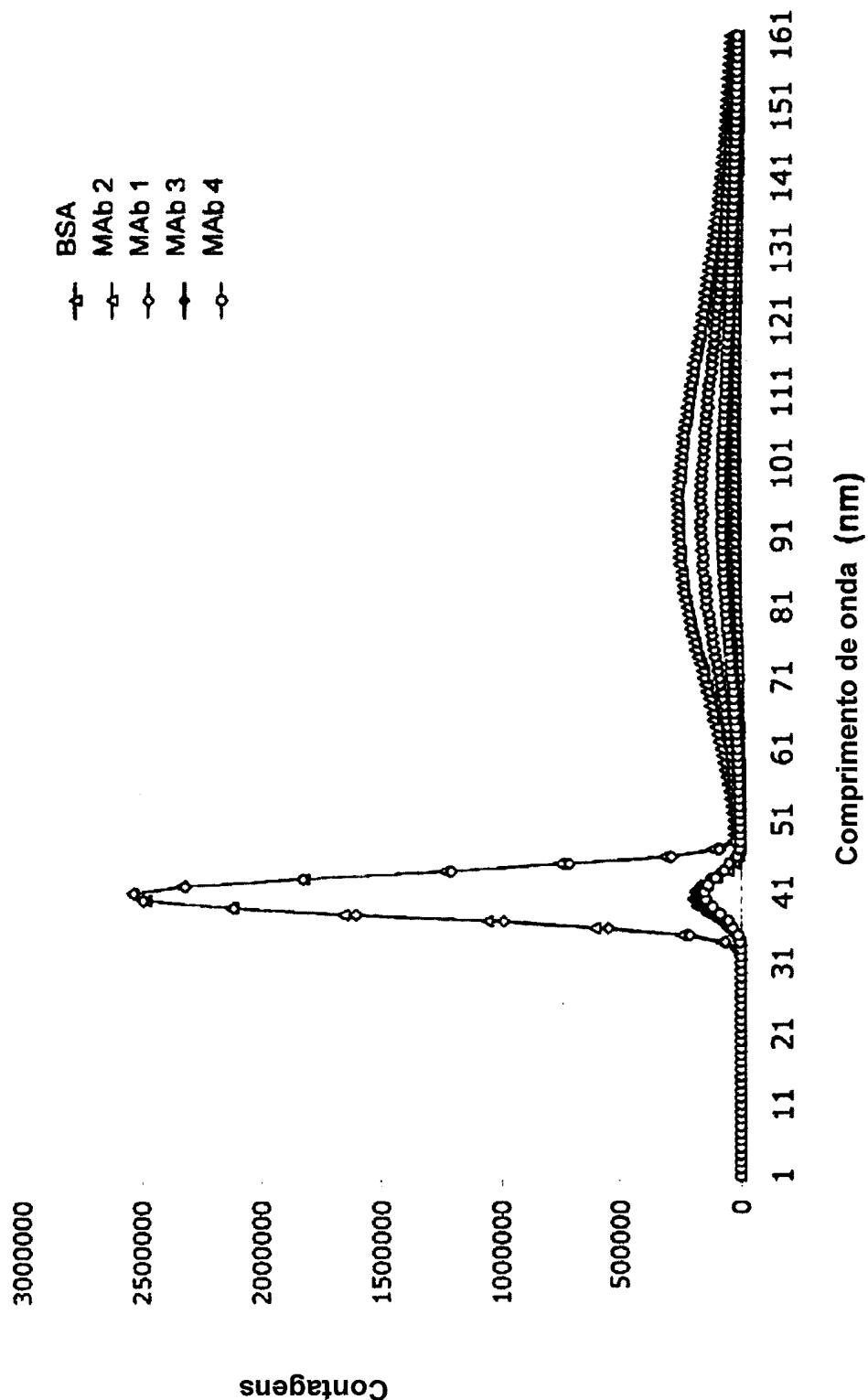


FIG. 5A

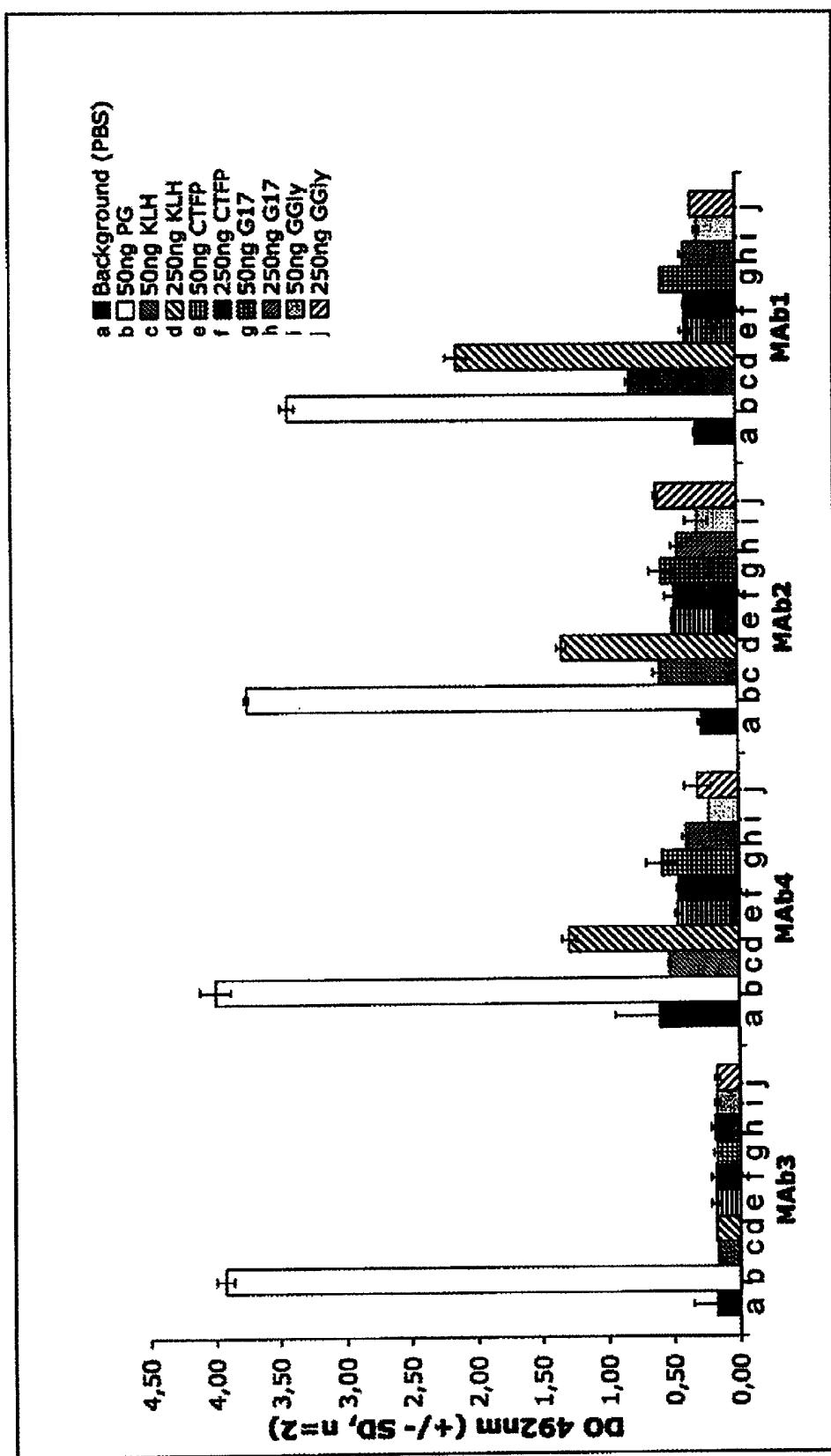


FIG. 5B

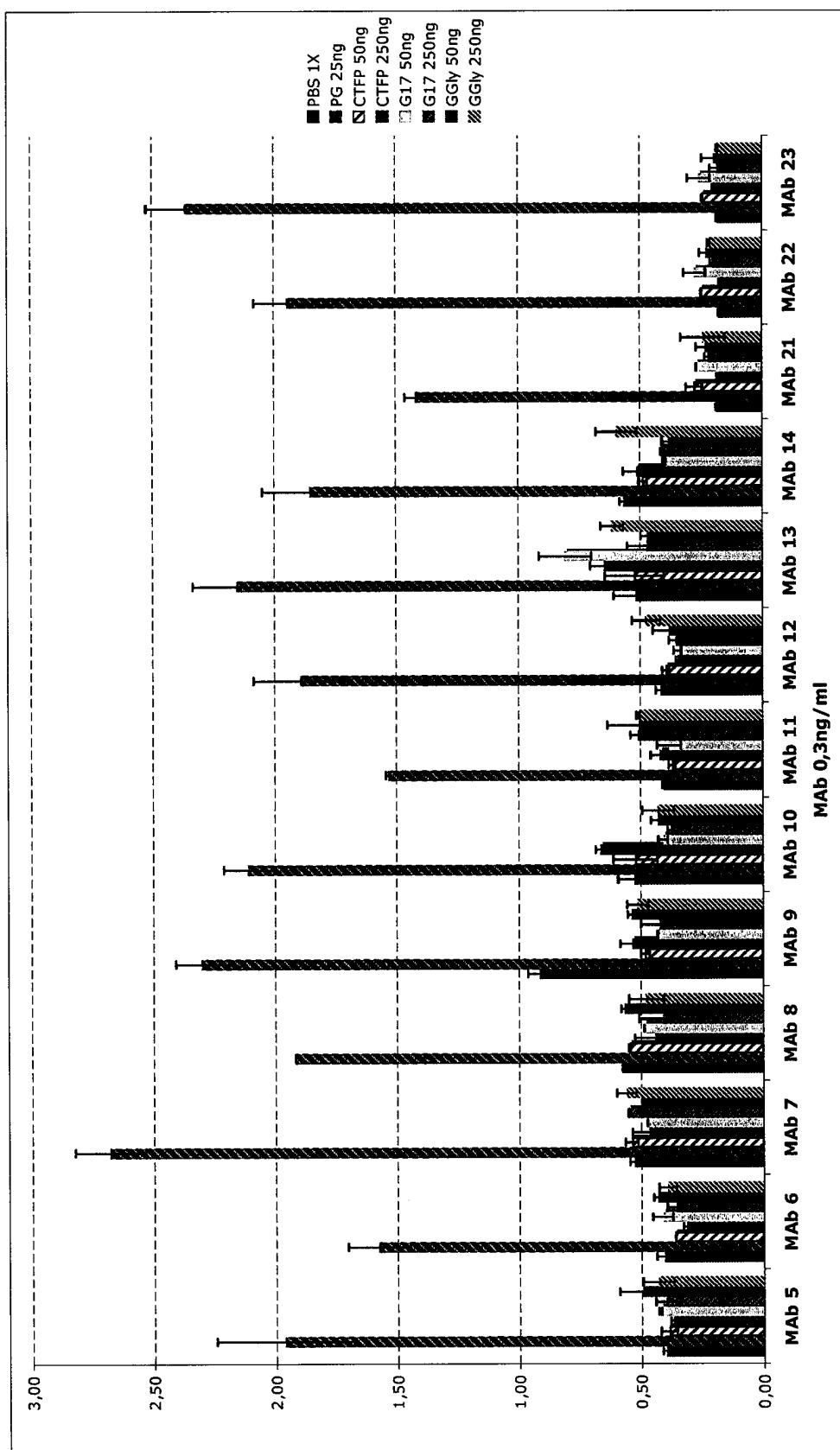


FIG. 5C

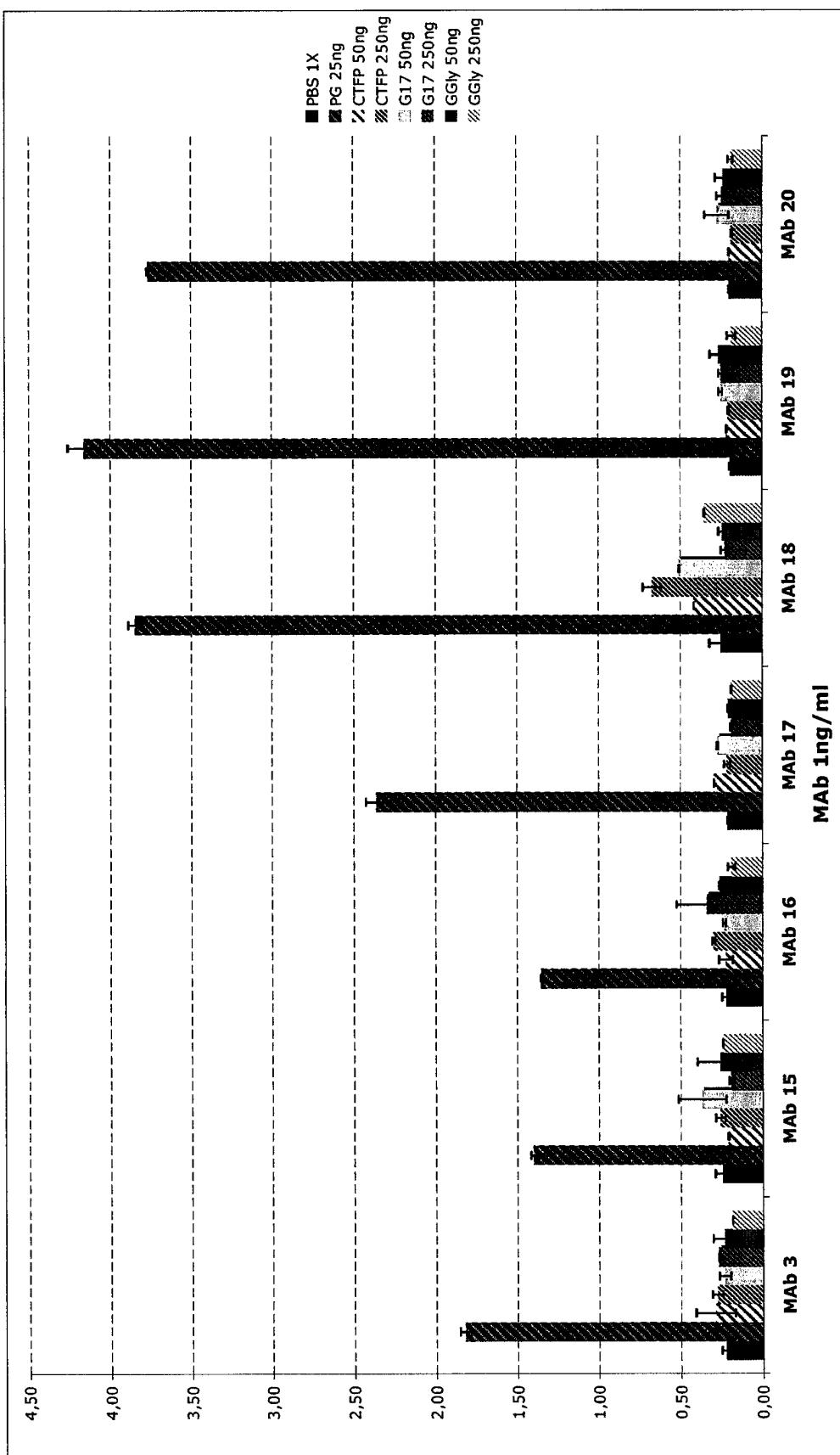
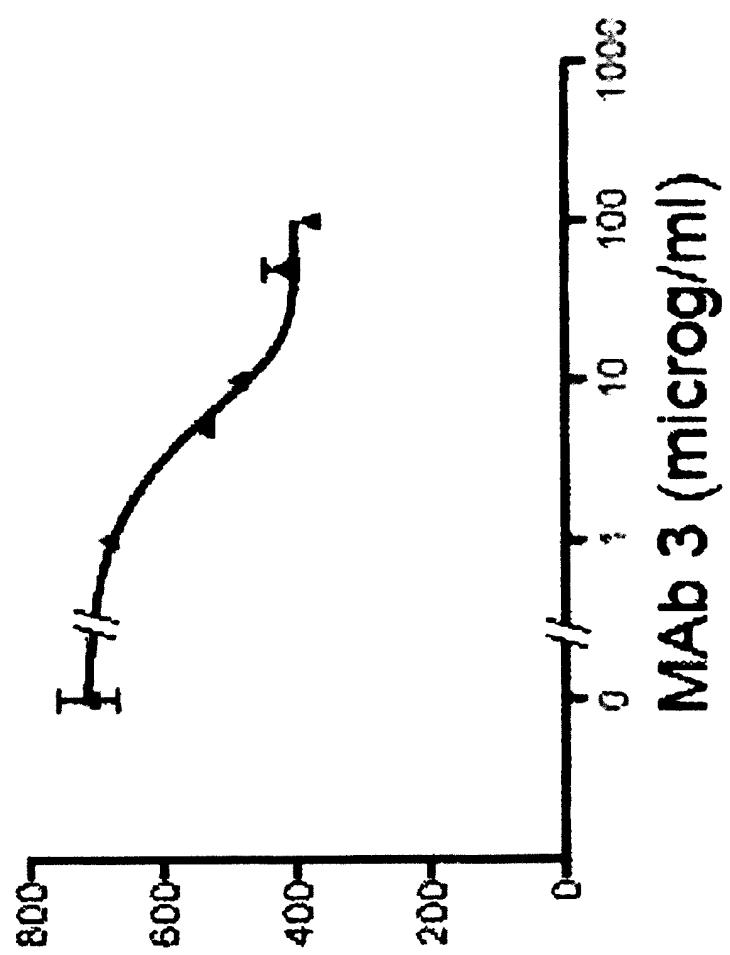


FIG. 6



Luminescencia (RLU) (+/-SD, n=2)

FIG. 7A

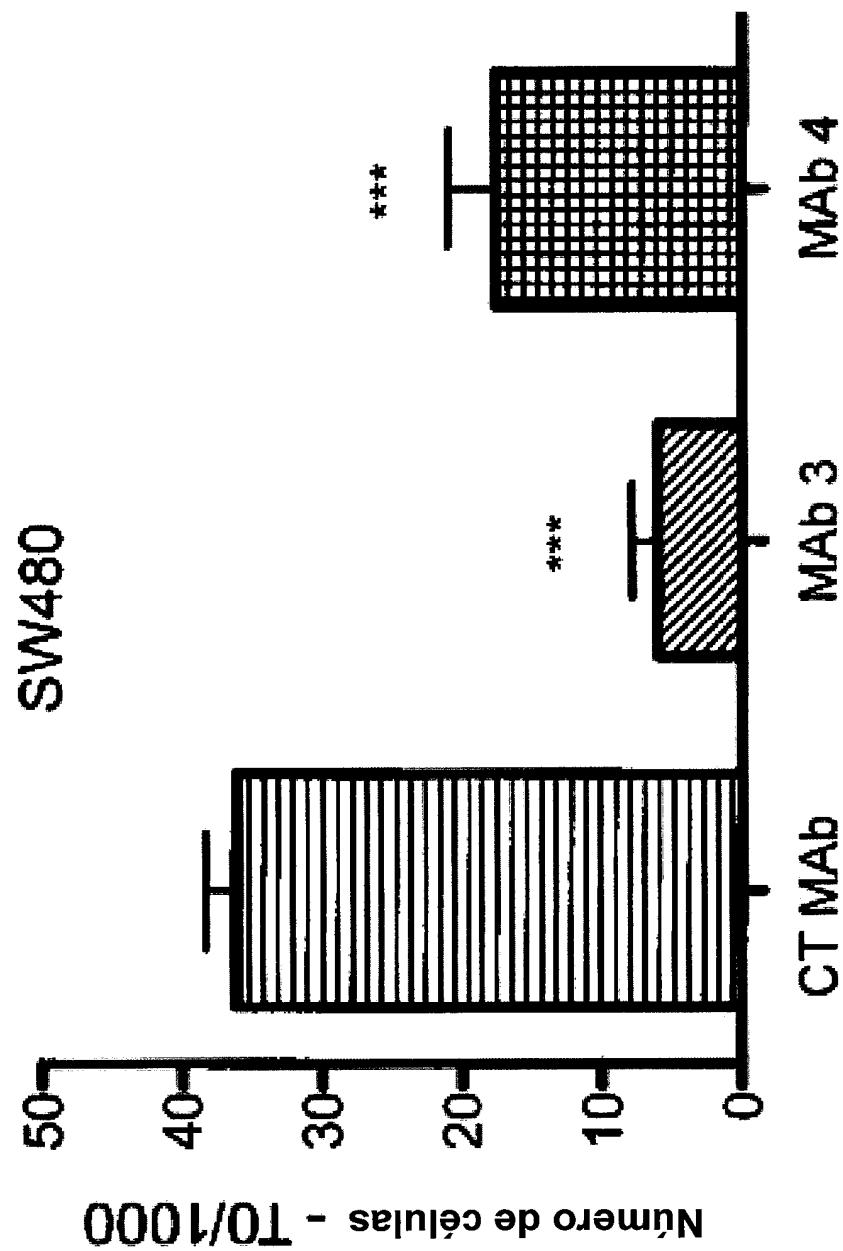


FIG. 7B

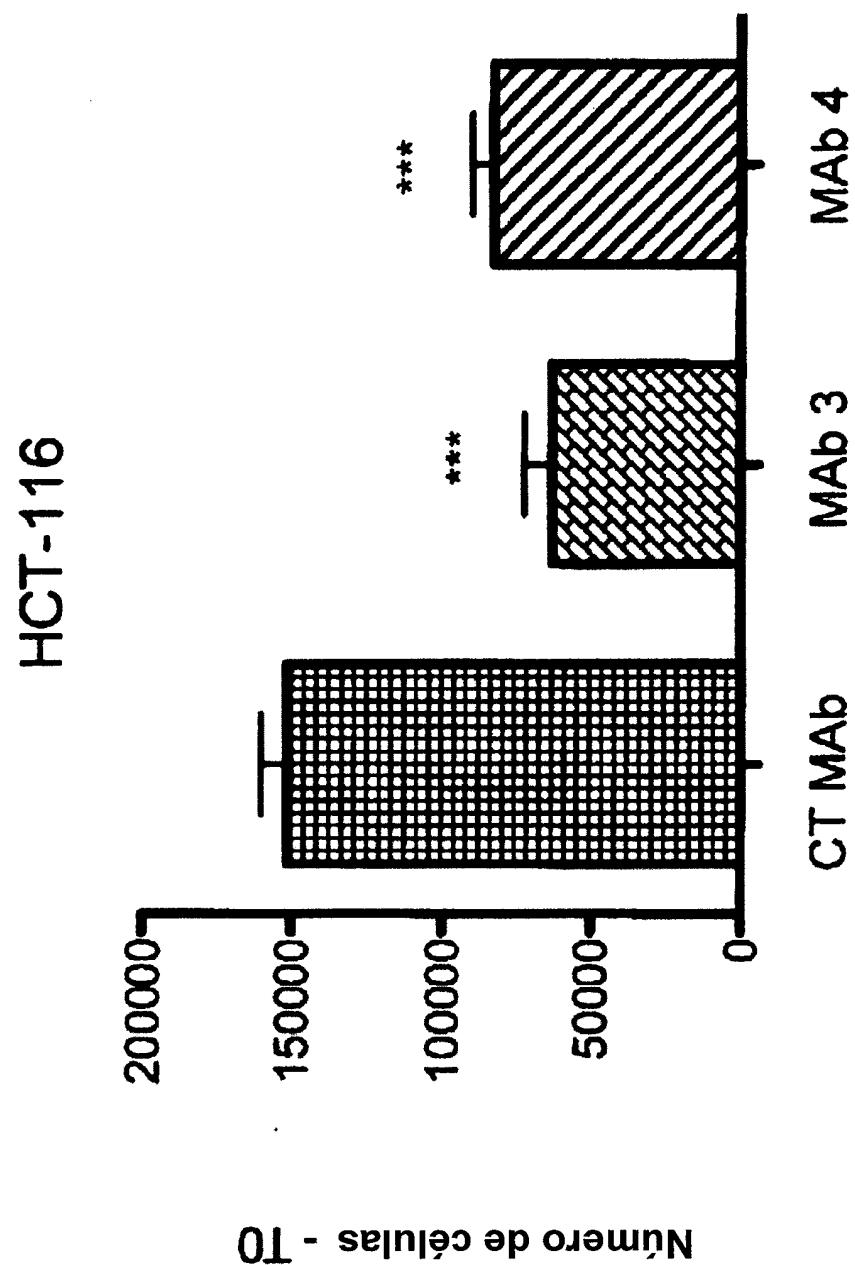


FIG. 7C

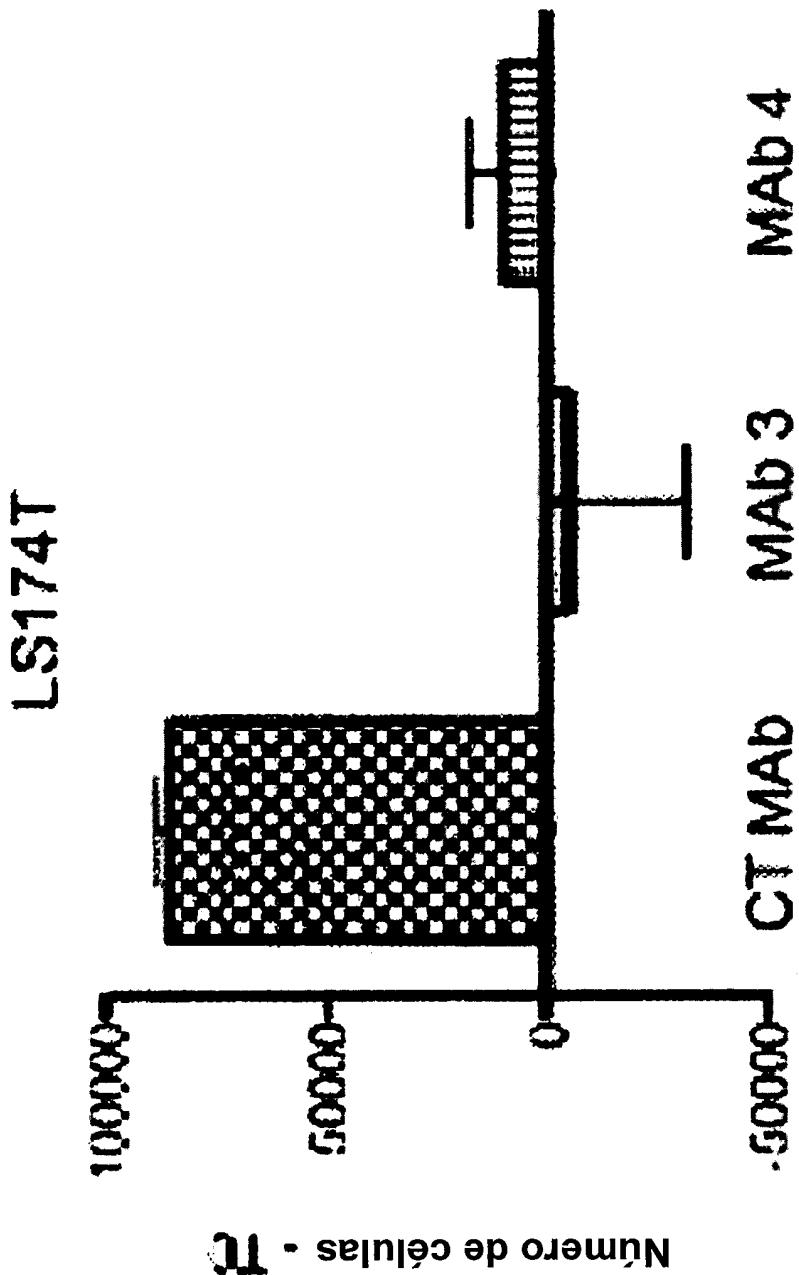


FIG. 7D

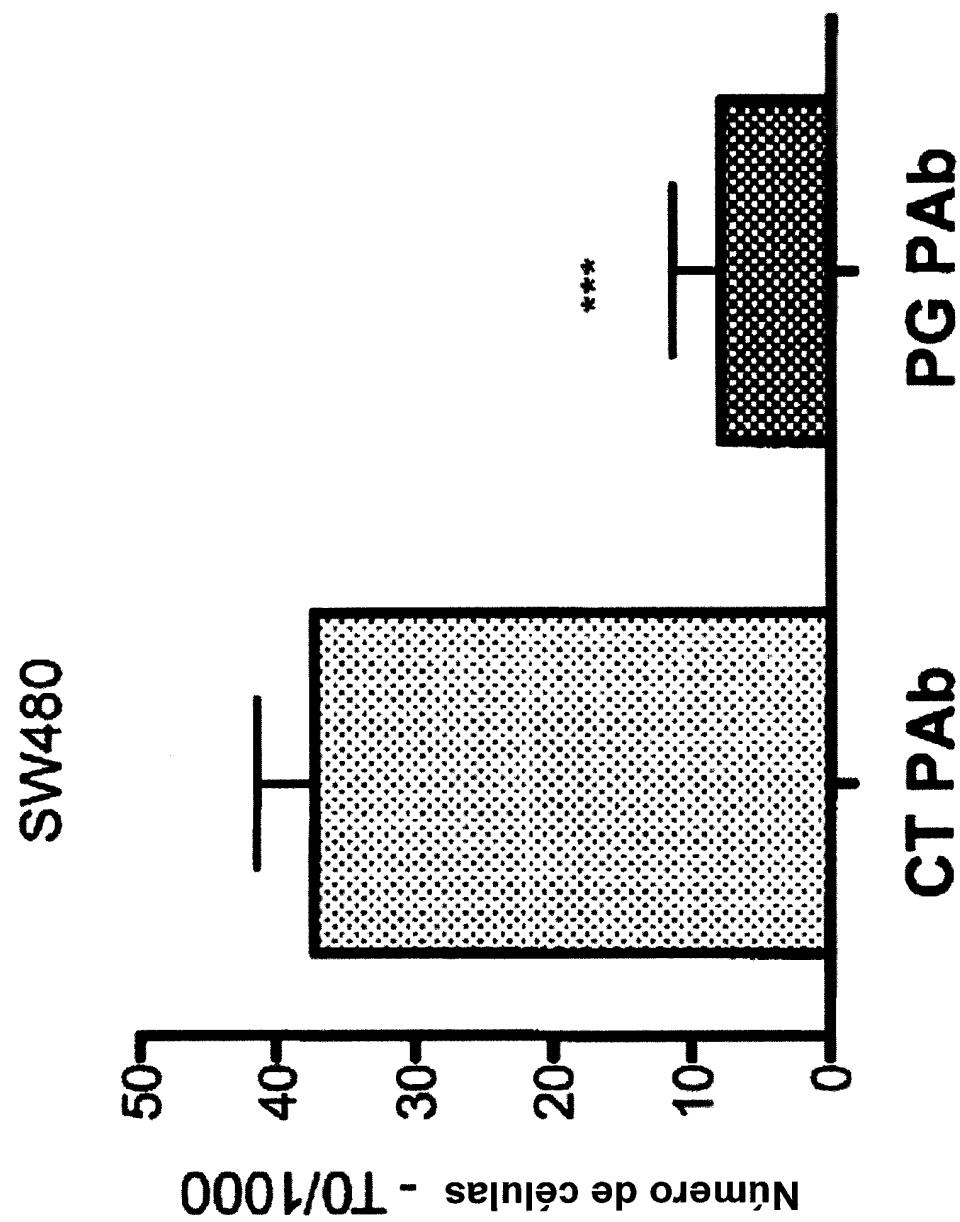


FIG. 7E

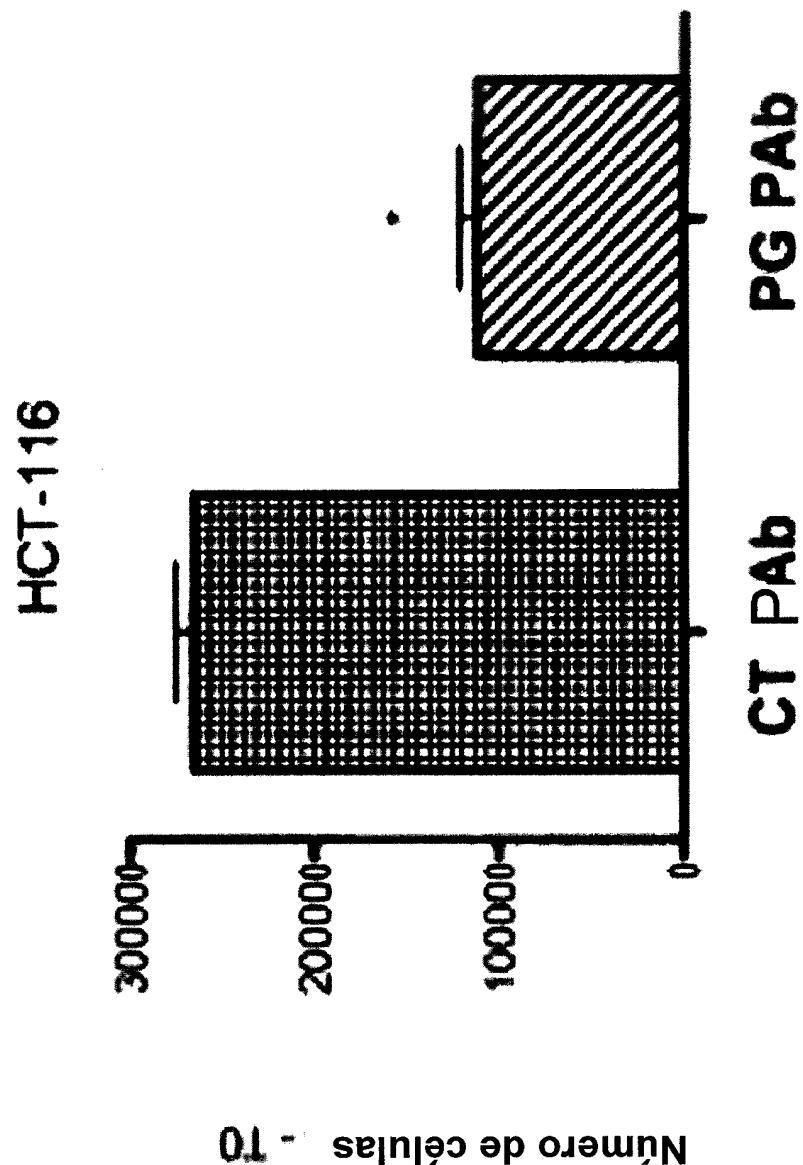


FIG. 7F

LS174T

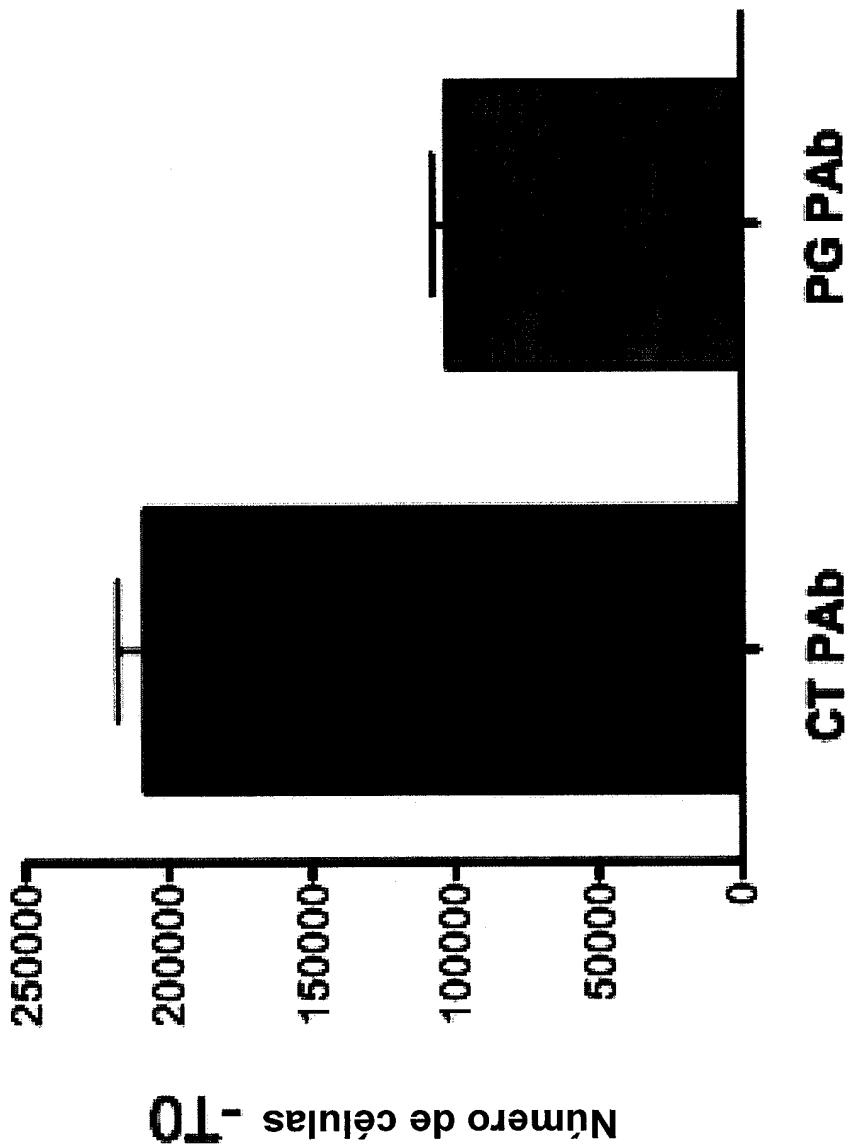


FIG. 7G

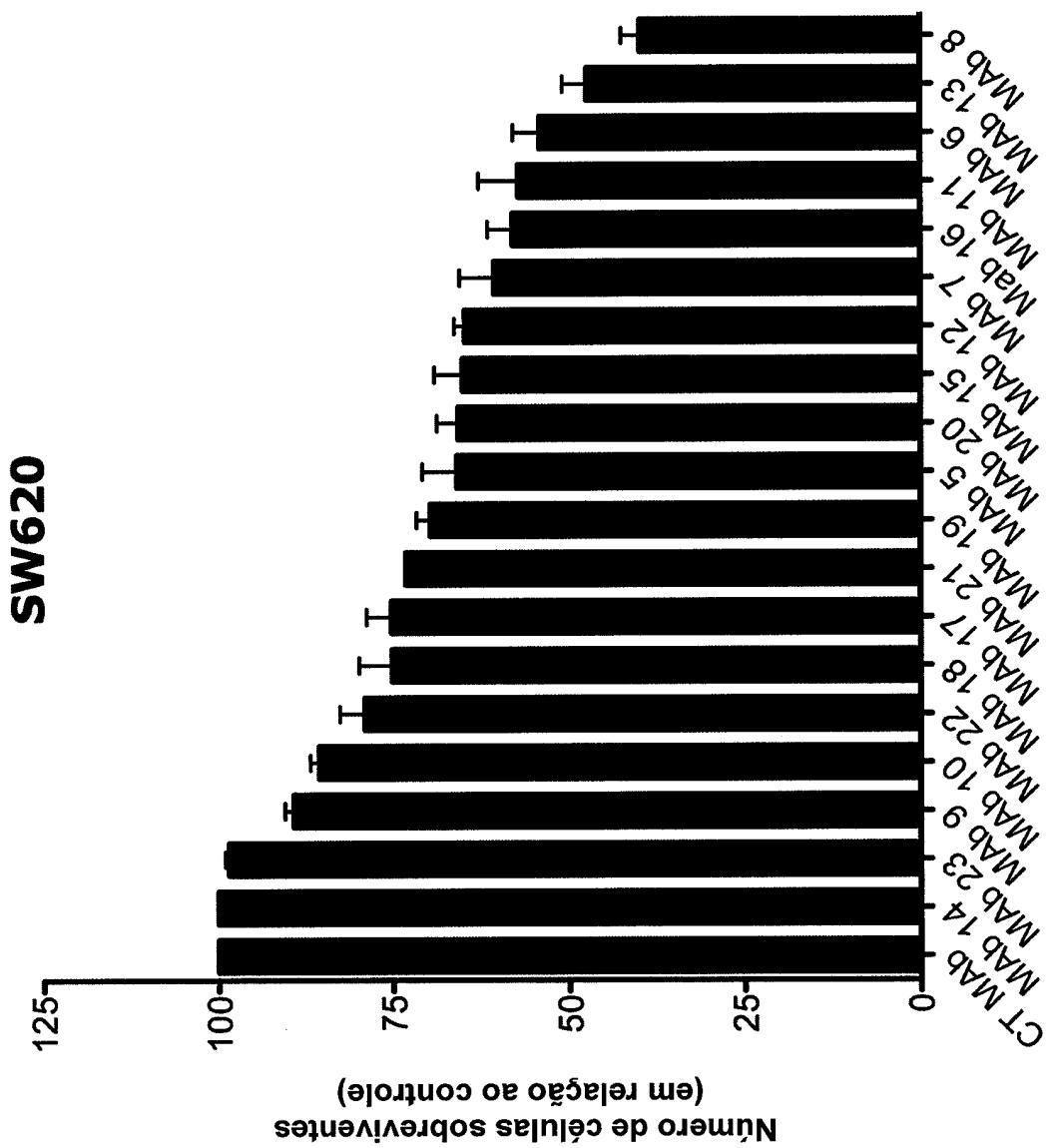


FIG. 7H

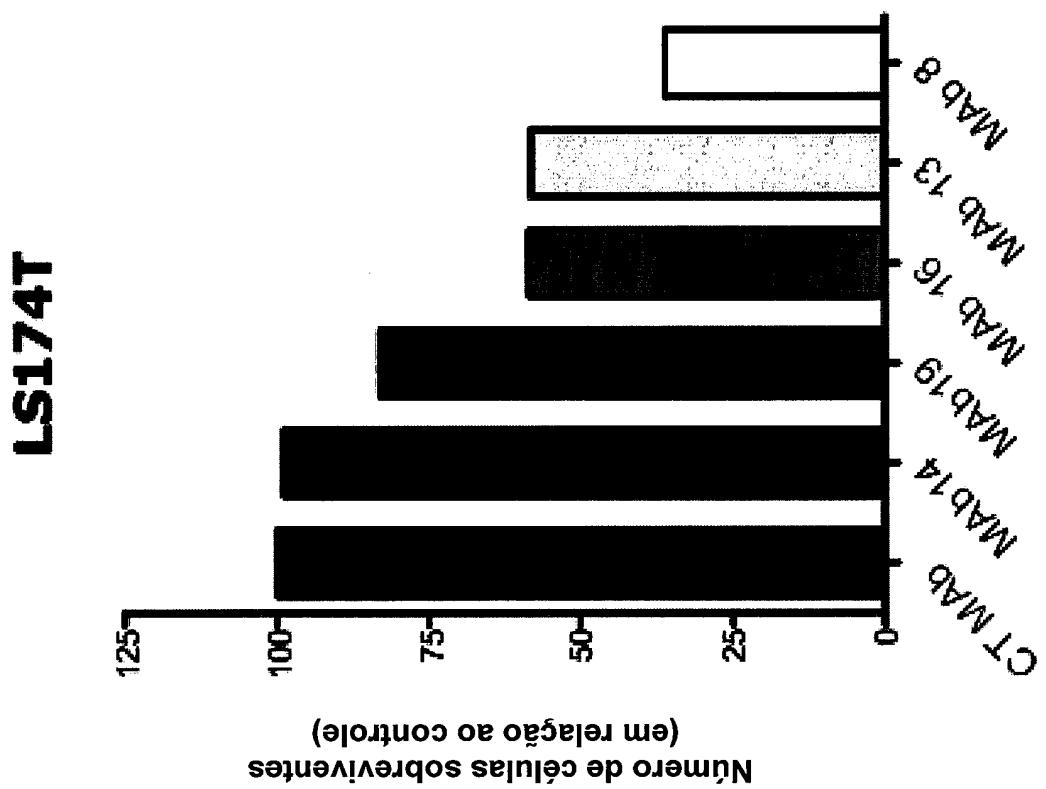


FIG. 7I

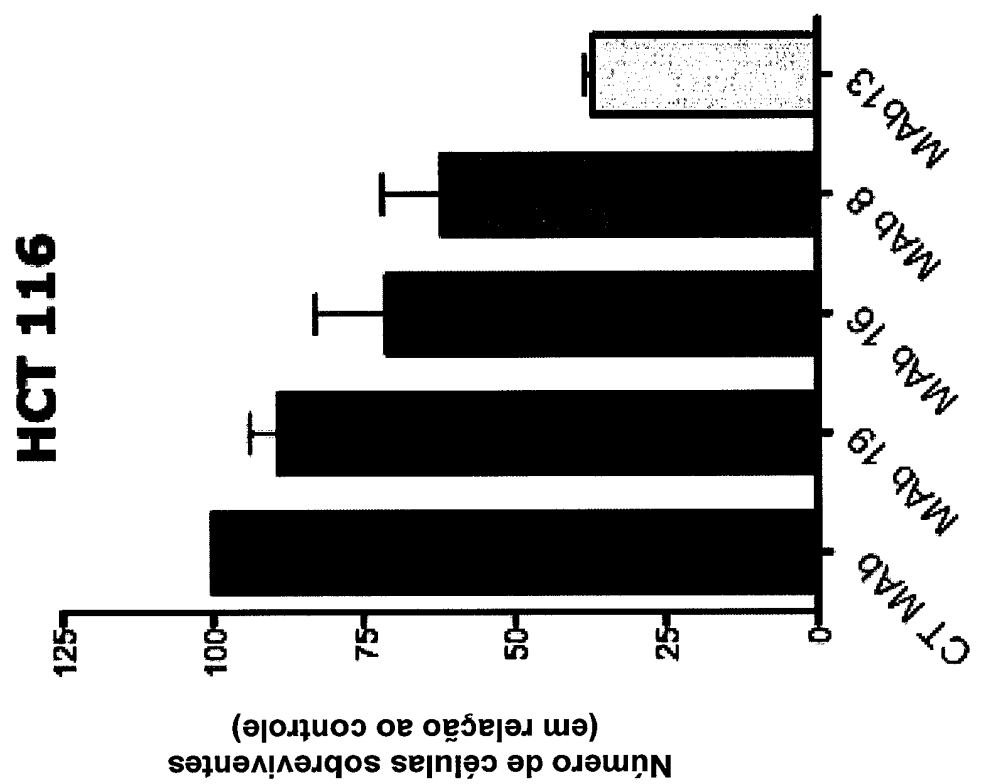


FIG. 8

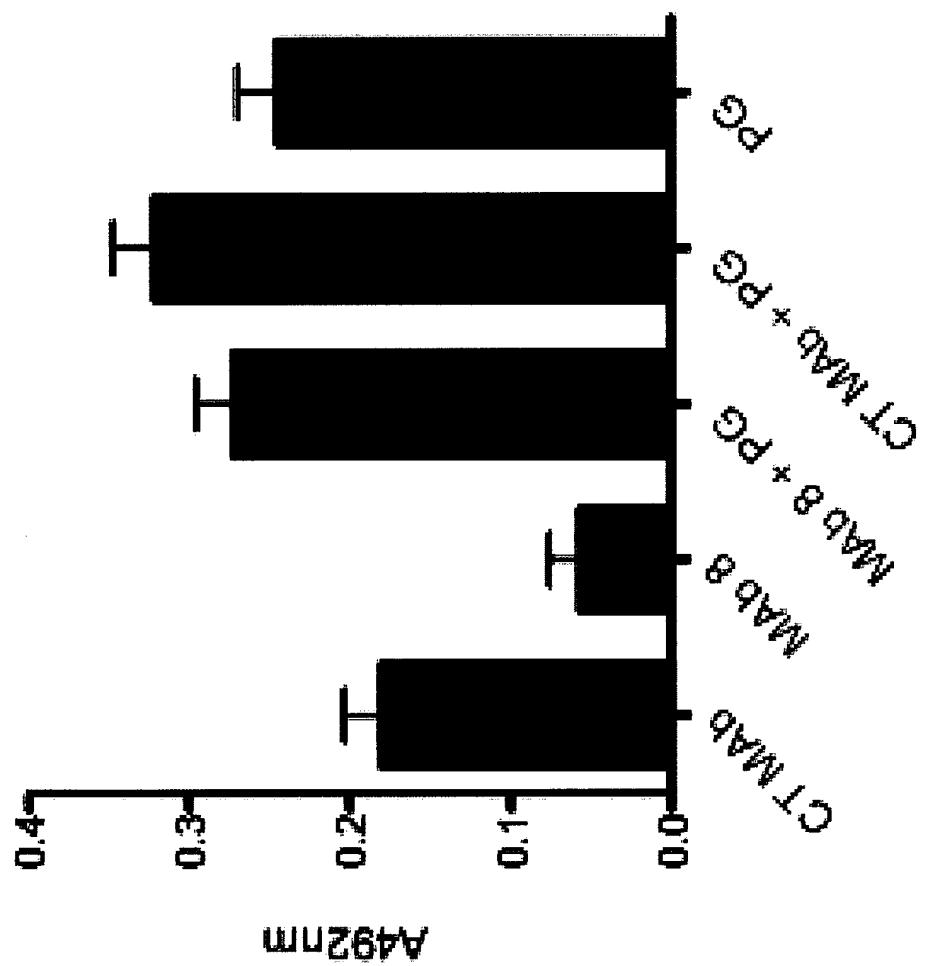


FIG. 9A

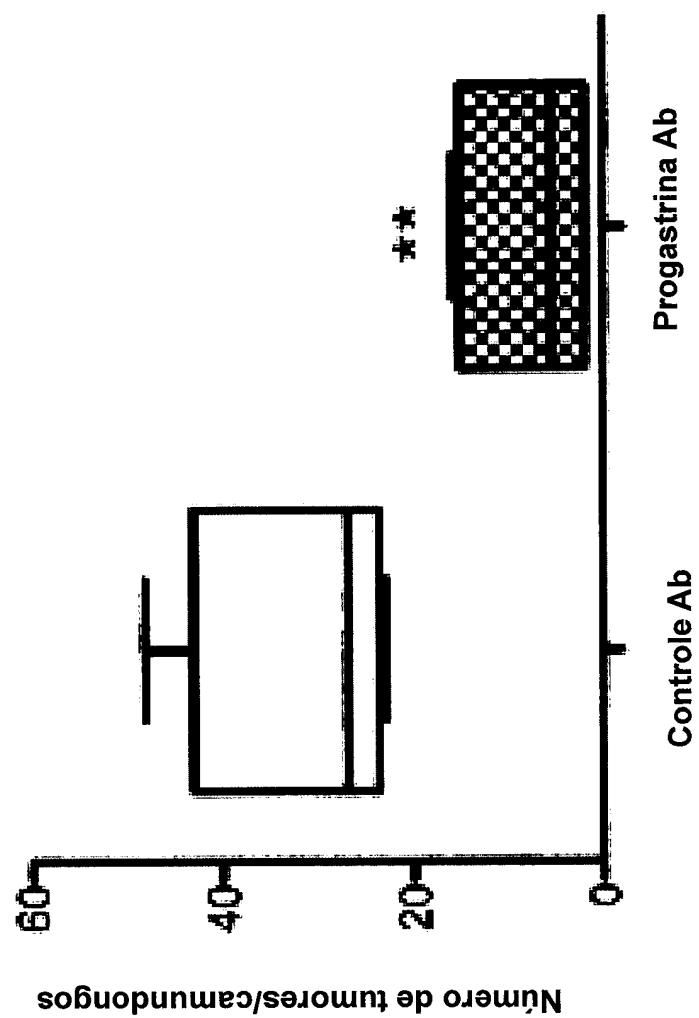


FIG. 9B

