

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFI
CARRER/
BOGOTÁ

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496- -00010-0000

347 3611
11 8650
00 4814
75 7743

Señor Director
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Fecha: 2011-10-10 16:58:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 111

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 06034496
Asunto : Solicitud de patente para: "Anticuerpos dirigidos a M-CSF".
Solicitante : WARNER LAMBERT COMPANY, LLC AND AMGEN FREMONT INC.
Fecha de solicitud: 7 de Abril de 2006.

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. 8911 notificado por fijación en lista del 3 de junio de 2011. Mediante memorial radicado el 30 de agosto de 2011 solicité un plazo de treinta (30) días para dar respuesta a este oficio.

2. Mediante oficio No. 8911 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio son las siguientes:

3. De la solicitud de patente:

Su Despacho concluye que el capítulo reivindicatorio de la presente solicitud no cumple con los requisitos de claridad y concisión de acuerdo con el artículo 30 de la Decisión 486 respectivamente. Su Despacho enuncia:

- "La composición farmacéutica mencionada en la reivindicación 7 debe caracterizarse a partir de los elementos y proporciones de los mismos que la componen. Específicamente debe indicarse el vehículo farmacéuticamente aceptable que la compone y que esta sustentado en la descripción".
- "La línea celular mencionada en las reivindicaciones 8 y 9 debe ser caracterizada a partir de sus propias características, incluido el número del depósito del hibridoma al que se refiere, y estar plenamente sustentada en la descripción".

- "La molécula de ácido nucleico reclamada en la reivindicación 10 debe ser definida a partir de la secuencia de nucleótidos. Adicionalmente, esta(s) secuencia(s) deben definir la totalidad del anticuerpo reclamado para que sean parte del cuerpo cierto de la invención. Lo mismo aplica para la reivindicación 11 que se refiere a un vector".
- "La célula huésped reclamada en las reivindicaciones 12 y 13 debe ser descrita como una célula recombinante, en caso contrario podría no ser objeto de patente".

Con respecto a lo señalado por su Despacho mi representada desea señalar lo siguiente:

3.1 Modificación de la solicitud en trámite:

Con el fin de atender las anteriores observaciones y de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486, se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio como sustituto de anteriormente presentado. De tal manera que, las objeciones formuladas a este respecto quedan superadas respectivamente con las modificaciones realizadas de la siguiente manera:

- Se ha revisado la redacción del capítulo reivindicatorio, de acuerdo con las sugerencias del Señor Examinador, con el fin de hacer claridad sobre la materia que se solicita proteger y sobre el alcance de la misma.
- En particular, en la nueva reivindicación 8 ahora se especifica el número del depósito del hibridoma del anticuerpo al que se refiere la línea celular, de conformidad con las enseñanzas reveladas en la descripción de la presente solicitud (Ver párrafo 0273). De modo que, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.
- De otro lado, la reivindicación 9 no ha sido incluida en el nuevo pliego reivindicatorio y por tanto, la objeción formulada a este respecto también se debe tener por superada.
- La molécula de ácido nucleico reclamada en la reivindicación 10 (nueva reivindicación 9) se encuentra ahora definida a partir de la secuencia de nucleótidos que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos reivindicados, de conformidad con las sugerencias del Señor Examinador.
- La célula huésped reclamada en las reivindicaciones 12 y 13 (nuevas reivindicaciones 11 y 12) se encuentran ahora definidas como una "célula recombinante", y por tanto, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

CAVELIER

ABOGADOS

- Adicionalmente, se han incluido las reivindicaciones 14 a 19, las cuales se refieren a anticuerpos monoclonales o una porción de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente a la M-CSF y se caracterizan porque la cadena pesada o la liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o liviana del anticuerpo monoclonal 8.10.3F. Dichos anticuerpos, se encuentran debidamente sustentados en la información revelada en la reivindicación 19 original de la presente solicitud y en los párrafos 0122, 0179 y 0186 del pliego descriptivo.
- Con respecto a la objeción formulada a la reivindicación 7 en relación con el hecho de que la composición farmacéutica de interés debe caracterizarse a partir de los elementos y proporciones de los mismos que la componen, se aclara a su Despacho que debido a que el objeto de la presente solicitud es proporcionar anticuerpos humanos aislados o porciones de ligando antígeno de los mismos que se unen específicamente al factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF) y estos son novedosos e inventivos, el solicitante tiene derecho a reivindicar las composiciones farmacéuticas caracterizadas por contener dichos anticuerpos. Teniendo en cuenta lo anterior y el hecho de que el Examinador reconoce que el anticuerpo que se desea proteger con la presente solicitud de patente no se encuentra revelado en el estado del arte, vale la pena aclarar que una persona versada en la materia esta en capacidad de preparar y obtener composiciones que contengan los anticuerpos divulgados en la presente solicitud con sus conocimientos generales y por tanto, se considera que la Descripción cumple con el requisito de suficiencia.

De modo que, consideramos que no es necesario incluir los excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables en la composición revelada en la reivindicación 7, toda vez que una persona con conocimientos técnicos en el campo de formulación y pre-formulación de composiciones comprendiendo anticuerpos dirigidos a M-CSF esta en capacidad de preparar dichas composiciones conociendo el anticuerpo de interés.

Así entonces, con las anteriores aclaraciones y las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, el mismo es ahora claro y conciso y por tanto las objeciones formuladas a este respecto se deben tener por superadas. Sin embargo, en el evento que el Despacho considere que una modificación adicional sea necesaria, respetuosamente le solicito hacer uso de la facultad que le otorga el artículo 45 inciso 2. de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina a efecto de requerir nuevamente de nuestra parte cualquier complementación o aclaración.

3.2 Nueva solicitud divisional.

Adicionalmente, de conformidad con los lineamientos del artículo 36 de la Decisión 486, que permite al solicitante en cualquier momento

CAVELIER

ABOGADOS

del trámite dividir su solicitud, sin ampliar el objeto de la invención inicialmente solicitado, me permito presentar una (1) solicitud divisional cuyo objeto es proteger el anticuerpo 2.7.3.

La divisional se beneficiará de la fecha de prioridad, de acuerdo con lo establecido en el artículo 36 de la Decisión 486.

El nuevo capítulo descriptivo de la solicitud divisional tendría el siguiente título: "Anticuerpo 2.7.3 dirigido a M-CSF".

4. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, respetuosamente solicito se continúe con su tramitación.

5. Anexos:

- Nuevo pliego reivindicatorio de la solicitud original conformado por 19 reivindicaciones.
- Formulario para modificaciones de solicitud original.
- Nuevo pliego descriptivo.
- Formulario para modificaciones.
- Recibo por \$135.000 pesos por concepto de las 9 reivindicaciones en exceso de la décima reivindicación correspondientes a la solicitud original. Lo anterior, teniendo en cuenta que en la anterior modificación se realizó el pago de 4 reivindicaciones en exceso de la décima reivindicación.
- Memoria descriptiva y pliego reivindicatorio conformado por 1 reivindicación de la nueva solicitud divisional.
- Formulario para solicitud divisional.
- Recibos por concepto de presentación de solicitud.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén
T.P.A. No. 23.555

COLO-15777-845-001-3

106 MGM\MGM\ID-202389\WPC15777
c No. M-2011-202389\MGM



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1

SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material

☒ Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

Nombre: WARNER LAMBERT COMPANY, LLC y AMGEN FREMONT INC

Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 201 Tabor Road
Morris Plains,
New Jersey 07950,
Estados Unidos de América

y

6701 Kaiser Drive,
Fremont,
California 94555
Estados Unidos de América

Respectivamente

Domicilio: Morris Plains,
New Jersey,
Estados Unidos de América

y

Fremont,
California,
Estados Unidos de América

Respectivamente

Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70

E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: Luz Clemencia de PAEZ

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11

E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Número: 35.456.344 TP 23.555

4

Número de expediente: 06.034.496

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 19 reivindicaciones con el fin de superar las

objecciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que

el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

6

Comprobante de pago No. 11-0094751
Comprobante de pago No. 11-0094789
Comprobante de pago No. 11-0096280

Fecha: 27 de septiembre de 2011
Fecha: 27 de septiembre de 2011
Fecha: 30 de septiembre de 2011

7

Anexos

- ☐ Comprobante de pago de la tasa por \$118.000, por concepto de modificaciones.
- ☒ Comprobante de pago por 5 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$135.000.00.
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.
- ☐ Copia auténtica de la sustitución que del poder otorgado por la Sociedad Solicitante hizo el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.

8

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA: Luz Clemencia Solé Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555

MGM



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1 SOLICITUD DE:		
☐ Conversión. ☒ División ☐ Fusión		
☐ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de Diseño Industrial ☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: WARNER LAMBERT COMPANY, LLC y AMGEN FREMONT INC Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Dirección: 201 Tabor Road, Morris Plains, New Jersey 07950, Estados Unidos de América y 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, Estados Unidos de América Respectivamente Domicilio: Morris Plains, New Jersey, Estados Unidos de América y Fremont, California, Estados Unidos de América Respectivamente Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACIÓN C.C.☐ C.E.☐ NIT☐ Otro☐ Cual Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com.	IDENTIFICACIÓN C.C.☒ C.E.☐ NIT☐ Otro☐ Cual Número

Número 35.456.344 T.P 23.555

4 CONVERSIÓN Expediente No: _____ De: _____ A: _____	5 DIVISIÓN Expediente No: <u>06.034.496</u> No. de Divisionales: <u>1</u>	6 FUSIÓN Expediente No: _____ Expediente No: _____
7 Comprobante de pago No.: <u>11-0096330</u> Fecha: <u>30 de septiembre de 2011</u>		
8 Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por 571.000.oo ☒ Poderes, si fuere el caso ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la Solicitud Divisional.		
9	NOMBRE: <u>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</u> FIRMA: <u><i>Luz Clemencia de Paez</i></u> C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555	

206

MGM

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.034.496. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 8911 notificado por fijación en lista del 03 de junio de 2011. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 7 de abril de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 10 de septiembre de 2003.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.034.496.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la M-CSF, caracterizado porque el anticuerpo comprende:

a) una cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 30 (residuos 45-54, 69-85 y 118-129, respectivamente) y una cadena liviana que comprende las secuencias de amino ácido de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 32 (residuos 44-55, 71-77 y 110-118, respectivamente), o

b) una cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 26 (residuos 45-54, 69-85 y 118-123, respectivamente) y una cadena liviana que comprende las secuencias de amino ácido de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 en la SEQ ID NO: 28 (residuos 46-56, 72-78 y 111-119, respectivamente).

2. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 30 (residuos 20-141) o SEQ ID NO: 26 (residuos 20-135).

3. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena liviana en la SEQ ID NO: 32 (residuos de 21 a 129) o SEQ ID NO: 28 (residuos 23-130).

4. El anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada y liviana son las siguientes:

a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 30 (residuos 20-141) y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena liviana en la SEQ ID NO: 32 (residuos 21-129), o

b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada en la SEQ ID NO: 26 (residuos 20-135) y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena liviana en la SEQ ID NO: 28 (residuos de 23 a 130).

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 sin la secuencia de señales de residuos de 1-19, y en donde la cadena liviana consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 sin la secuencia de la señal de los residuos 10-20.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 sin la secuencia de señales de los residuos 1-19, y en donde la cadena liviana consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 sin la secuencia de señales de los residuos 1-22.

7. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo o una porción de unión al antígeno de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

8. Una línea de células aisladas que produce el anticuerpo 8.10.3 con ATCC No. de acceso PTA-5395 o el anticuerpo 9.14.4 con ATCC No. de acceso PTA-5394 o un anticuerpo con la misma secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y liviana CDR del anticuerpo 8.10.3 o 9.14.4.

9. Una molécula de ácido nucleico aislada caracterizada porque comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada, o una porción de unión al antígeno del mismo, o la cadena liviana, o una porción de unión al antígeno del mismo, o tanto la cadena pesada y la cadena liviana, o una porción de unión al antígeno del mismo, de un anticuerpo anti-M-CSF, en donde la cadena pesada o liviana es codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID Nos: 25, 27, 29, y 31, sin secuencia señal.

10. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el vector comprende una secuencia de control de la expresión unida operativamente a dicha molécula de ácido nucleico.

11. Una célula huésped recombinante aislada caracterizada porque comprende el vector según la reivindicación 10 o la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9.

12. La célula huésped recombinante aislada según la reivindicación 11 caracterizada porque comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana del anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

13. Un método para hacer un anticuerpo anti-M-CSF o parte de unión al antígeno del mismo, caracterizado porque comprende:

1) cultivar la célula huésped recombinante según la reivindicación 11 o la línea celular según la reivindicación 8 por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de los anticuerpos o parte de la célula huésped o línea celular y

2) recuperar el anticuerpo o porción utilizando métodos de purificación de proteínas.

14. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la M-CSF, caracterizado porque la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 8.10.3F (SEQ ID NO:30 sin secuencia señal).

15. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 8.10.3F (SEQ ID NO:30 sin secuencia señal).

16. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 8.10.3F (SEQ ID NO:30 sin secuencia señal).

17. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la M-CSF, caracterizado porque la

cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo monoclonal 8.10.3F (SEQ ID NO:30 sin secuencia señal).

18. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo monoclonal 8.10.3F (SEQ ID NO:30 sin secuencia señal).

19. Un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado porque la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana del anticuerpo monoclonal 8.10.3F (SEQ ID NO:30 sin secuencia señal).

MGM\MGM\ID-202393\WPC15777

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0094751

Bogotá D.C., Septiembre 27 de 2011 - 13:30:23

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	27984	29/03/2011		361.000.00
RECIBO DE CA	999999999	30653	05/04/2011		27.000.00
RECIBO DE CA	999999999	30654	05/04/2011		27.000.00
RECIBO DE CA	999999999	30840	05/04/2011		5.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00	5.000.00
			\$5.000.00

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496- -00010-0000

Fecha: 2011-10-10 16:58:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 111

COLO: 15777 - 845 - 001 - 3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870294 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 27 de 2011 - 13:30:26

2011-44807

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0094789

Bogotá D.C., Septiembre 27 de 2011 - 14:19:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	28081	29/03/2011		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	28082	29/03/2011		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	28083	29/03/2011		1.000.00
RECIBO DE CA	999999999	30645	05/04/2011		14.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	21 CERTIFICACIONES	14.000.00	14.000.00
			\$14.000.00

SON: **CATORCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-034496- -00010-0000

Fecha: 2011-10-10 16:58:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 111

Colo: 15777-845-001-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 27 de 2011 - 14:19:32

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0096280

Bogotá D.C., Septiembre 30 de 2011 - 16:43:43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431630006	30/09/2011	50.491.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN N. CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	118.000.00	118.000.00
				\$118.000.00

SON: **CIENTO DIECIOCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 06-034496- -00010-0000
Fecha: 2011-10-10 16:58:54 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 111

COLO: 15777- 845- 001-3

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mai: Info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 30 de 2011 - 16:43:49



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1 SOLICITUD DE:		
☐ Conversión. ☒ División ☐ Fusión		
☐ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		
☐ Registro de Diseño Industrial ☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: WARNER LAMBERT COMPANY LLC y AMGEN FREMONT INC Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Dirección: 201 Tabor Road, Morris Plains, New Jersey 07950, Estados Unidos de América y 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, Estados Unidos de América Respectivamente Domicilio: Morris Plains, New Jersey, Estados Unidos de América y Fremont, California, Estados Unidos de América Respectivamente	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
	Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>35.456.344</u> T.P <u>23.555</u>

4 CONVERSIÓN Expediente No: _____ De: _____ A: _____	5 DIVISIÓN Expediente No: <u>06.034.496</u> No. de Divisionales: <u>1</u>	6 FUSIÓN Expediente No: _____ Expediente No: _____
7 Comprobante de pago No.: <u>11-0096330</u> Fecha: <u>30 de septiembre de 2011</u>		
8 Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por 571.000.00 ☒ Poderes, si fuere el caso ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la Solicitud Divisional.		
9 NOMBRE: <u>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</u> FIRMA: <u>Luz Clemencia de Paez</u> C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555		
MGM		

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.034.496. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 8911 notificado por fijación en lista del 03 de junio de 2011. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 7 de abril de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 10 de septiembre de 2003.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.034.496.

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

775 19
73661
645

1. Country: United States of America

This public document

2. Has been signed by Angela S. Diorio

3. acting in the capacity of A Notary Public

4. Bears the seal/stamp of Angela S. Diorio - Notary Public
Commonwealth of Virginia

Certified

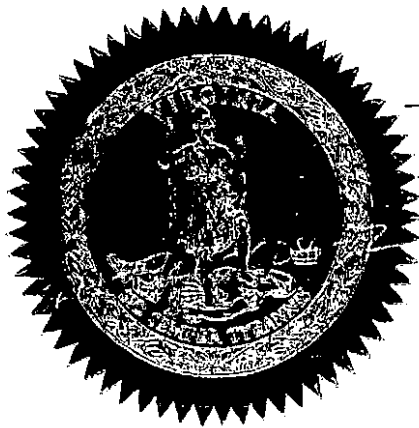
5. at Richmond Virginia

6. On February 5, 2007

7. by The Secretary of the Commonwealth

8. No. 2122698-7

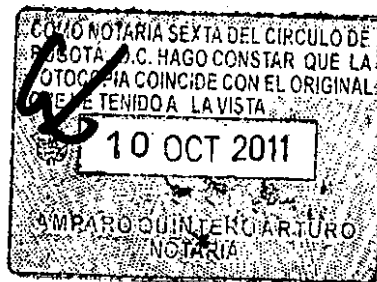
9. Seal/Stamp



10. Signature:

Katharine F. Hanley

Secretary of the Commonwealth



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-
ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

WARNER-LAMBERT COMPANY LLC

domiciliado (s) en/of 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950,
USA

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65.620, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn

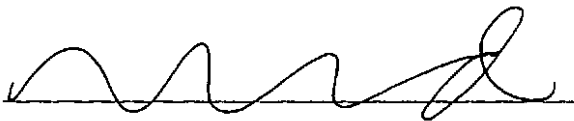


Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this January 29, 2007
cn/in Alexandra, WFA USA

por/by _____

Firma/Signature 

Elizabeth Norwood
Authorized Signatory



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de 200 ____ de _____

compareció(cron)
personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y
quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
before me, a Notary Public or Attesting Official
200 ____ of _____

personally
appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los 29 días del mes de Enero
de 200 7 compareció(cron) ante mí,

Elizabeth Norwood

Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada

Warner-Lambert Company, LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

PODER FIRMADO Y FECHADO 29 ENERO 2007

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que es una Sociedad/Compañía

legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del
Estado de

DELAWARE

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

Morris Plains, NJ

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.)

ELIZABETH NORWOOD

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this 29TH day of JANUARY
200 7 appeared before me

ELIZABETH NORWOOD

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named

WARNER-LAMBERT COMPANY, LLC

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

POWER OF ATTORNEY

ISSUED & DATED 29 JANUARY 2007

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That is a Corporation/Company legally

constituted and in existence in accordance with the laws of the
State of DELAWARE

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

MORRIS PLAINS, NJ

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of
Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set
forth in the charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.)

ELIZABETH NORWOOD

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney

© CAVELIER ABOGADOS
WPP0DE01-181

City of Alexandria
Commonwealth of Virginia
The foregoing instrument was acknowledged
before me this 29TH day of JANUARY
2007 by
ELIZABETH NORWOOD
(name of person seeking acknowledgment)



February 28, 2010 Embossed Hereon Is My
Commonwealth of Virginia Notary Public Seal
My Commission Expires February 28, 2010
ANGELA S. DIORIO

Ciudad _____

Estado _____

Hoy _____ de 200 _____

City ALEXANDRIA

State VIRGINIA

This 29th day of JANUARY 200 7

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: _____

This public document

2. has been signed by _____

3. acting in the capacity of _____

4. bears the seal/stamp of _____

Certified

5. at _____

6. the _____

7. by _____

8. No. _____

9. Seal/stamp _____

10. Signature _____



TRADUCCIÓN OFICIAL No. 07/03.07 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual WARNER-LAMBERT COMPANY LLC, sociedad domiciliada en 201 Tabor Road, Morris Plains, NJ 07950, Estados Unidos de América, otorga poder a EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y DANIEL PEÑA.

Dado y firmado el 29 de enero de 2007
en Alexandria, Virginia, Estados Unidos de América
por: _____

Firma: [Firma Ilegible]
Elizabeth Norwood
Firmante Autorizado

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de WARNER-LAMBERT COMPANY LLC y a la capacidad legal de Elizabeth Norwood para otorgar el poder anterior.

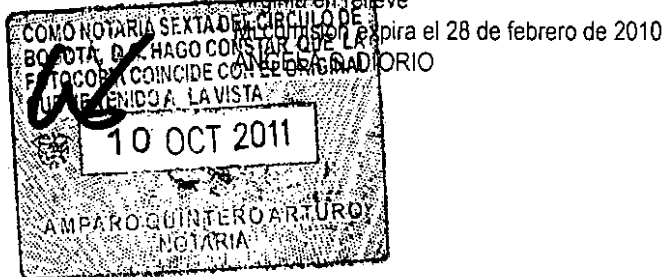
Ciudad: Alexandria

Estado: Virginia

Hoy 29 de enero de 2007

Ciudad de Alexandria
Estado de Virginia
El instrumento anterior fue reconocido ante mí hoy 29 de enero de 2007 por
Elizabeth Norwood
(nombre de la persona que solicita el reconocimiento)
[Firma ilegible]
Notario Público
Mi comisión expira el 28 de febrero de 2010

Este es mi Sello de Notario Público del Estado de Virginia en relieve



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. Ha sido firmado por Angela S. Diorio - Notario Público

3. Actuando en su capacidad de Notario Público

4. Lleva el sello/timbre de Angela S. Diorio - Notario Público
Estado de Virginia.

Certificado

5. En Richmond, Virginia 6. el 5 de febrero de 2007

7. Por el Secretario de Estado

8. No. 2122698-7

9. Sello: (sellõ seco) SELLO DEL ESTADO DE VIRGINIA:

10. Firma: [Firma Katherine K. Hanley]
Secretario de Estado.

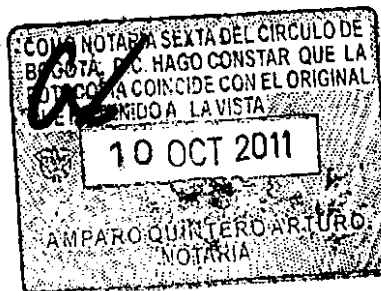
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 13661-806-004-2

WPC 13661 - ID 220

MAR 08/07

Maria E. Martelo
TRADUCCION No: 07/03.07
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



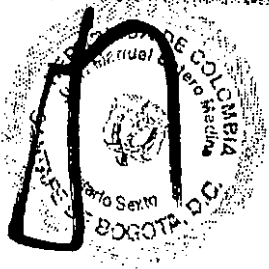
NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2001 MAR -8 P 12:28
2001 MAR -8 P 12:28
DE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C. DE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
831260
831255
CUYA FIRMA
DOCUMENTO
LAS FUNCIONES

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
10 OCT 2041
MINISTERO INTERIO
NOTARIA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 08 MAR 2007



CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : WARNER-LAMBERT COMPANY LLC

Poder conferido el : 29/01/2007

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

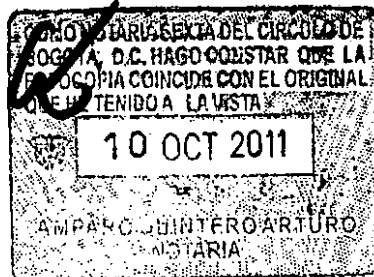
Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



20, OCT 2009

DATE: 06/08/2014

UNCLASSIFIED

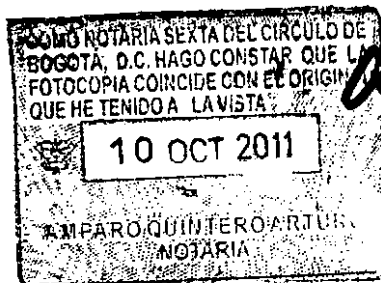
~~CONFIDENTIAL~~

Colony (C) - 10/10/1961 (a) C.A.

Y declaró (aron) que la(s) fe (s), fue (s) apócrifa(s) en el precarros documento ar (con) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo ay clerio.

En constancia se firma esta diligencia.

Guillermo Vences
Lic. Clementina Soler



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTATION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

AMGEN FREMONT INC., a corporation organized and existing under the laws of the State of Delaware, U.S.A. domiciliado (s) en/of 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555, United States of America National Phase of International Application No. PCT/US2005/000370

15413
6606

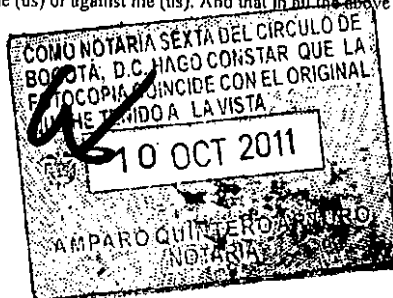
hereby ratify the Patent Application No. 06.077.165 filed by Emilio Ferrero on August 4, 2006.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters

© CAVELIER ABOGADOS
WPP0501-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)



BX-PF6
BX-0109

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 20 días del mes de OCTUBRE
de 2006 ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado
de California, EUA
Stuart L. Watt
a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 20th day of October
2006 before me, a Notary Public or Attesting Official of California, USA
personally appeared
Stuart L. Watt
to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has (have) legal
capacity to execute it.

Debra L. Merrill

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy 20 de OCTUBRE de 2006
Compareció(eron) ante mí
STUART WATT
quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este
documento en representación de la Sociedad/compañía
denominada AMGEN FREMONT INC.

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

CERTIFICADO DE FUSION & ACTAS DE LA JUNTA DIRECTIVA DE AMGEN FREMONT INC.

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que AMGEN FREMONT INC.

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes de ESTADO DE DELAWARE

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es FREMONT, CALIFORNIA

2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) STUART L. WATT
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.
Ciudad THOUSANDS OAKS
Estado CALIFORNIA
Hoy 20 OCTUBRE de 2006

Notario Público o Funcionario Autorizado -- Notary Public or Attesting Official

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 20th day of October 2006
appeared before me
Stuart Watt
who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Corporation/Company named AMGEN FREMONT INC.

I certify:

1. That I have seen the following documents:*

State of Delaware Certificate of Merger &
Minutes of Action of the Board of Directors of
Amgen Fremont Inc.

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Amgen Fremont Inc.
is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws the State of Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is State of California

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

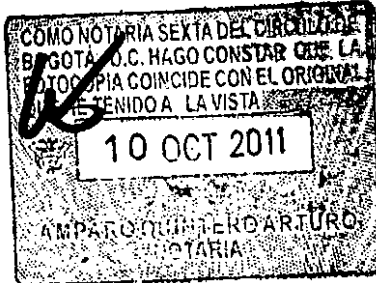
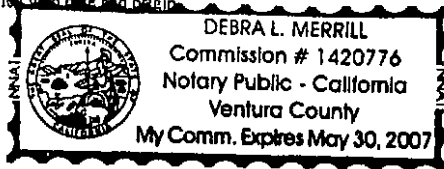
2.4. That Mr.(Messrs.) Stuart L. Watt
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney.
City Thousand Oaks
State California
This 20th day of October 2006

Debra L. Merrill

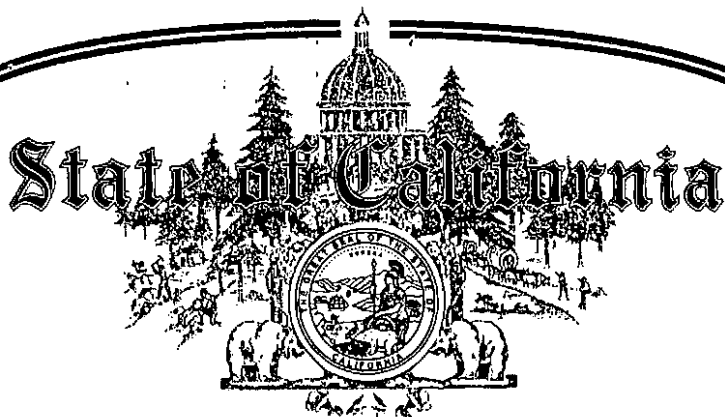
* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

* Documents must be identified with date and origin

© CAVELIER ABOGADOS
WPP0DE01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)



ABX-PF/6
ABX-0109



SECRETARY OF STATE

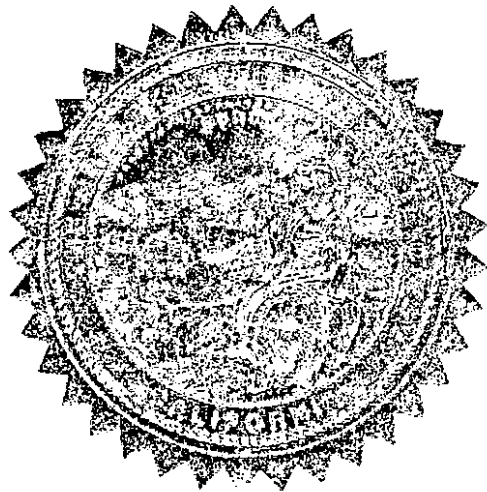
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

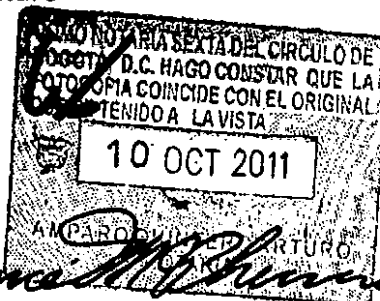
1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Debra L. Merrill*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Debra L. Merrill, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 9th day of November 2006*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 323785*
9. *Seal/Stamp:*



10. Signature



Debra L. Merrill

Secretary of State



Debra L. Merrill

pronuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del
proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de
agentes oficiosos.

they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit
the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by
representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this October 20, 2006

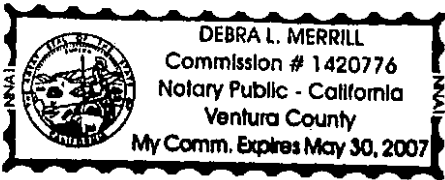
en/in Thousand Oaks, California, U.S.A.

por/by Stuart Watt, Vice President, Law

Firma Stuart L. Watt Signature

Subscribed and sworn before me, Debra L. Merrill
a Notary Public, this 20th day of October, 2006

Debra L. Merrill
Notary Public



CAVE 21

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15/11.06 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual **AMGEN FREMONT INC.**, una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMÁN CAVELIER**.

Dado y firmado el 20 de octubre de 2006

Por: Stuart Watt, Vicepresidente Jurídico

Firma [Firmado] Stewart L. Watt.

Suscrito ante mí, Debra L. Merrill, Notario público, hoy 20 de octubre de 2006.

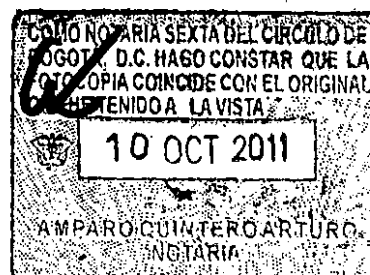
[Firmado] Debra L. Merrill

Notario público

DEBRA L MERRILL
Comisión # 1420776
Notario Público - California
Condado de Ventura
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO) en inglés y español referente a la firma de **Stewart L. Watt**. Dado el 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de **Amgen Fremont Inc.** Dado en la

Ciudad: Thousand Oaks

Estado: California

El 20 de octubre de 2006.

[Firmado] Debra L. Merrill, Notario Público.

[Firmado] Debra L. Merrill

Notario público

DEBRA L MERRILL
Comisión # 1420776
Notario Público - California
Condado de Ventura
Mi comisión expira el 30 de mayo de 2007

ESTADO DE CALIFORNIA

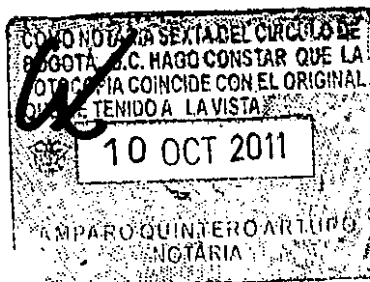
SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: *Estados Unidos de América*
Este documento público
2. *ha sido firmado por Debra L. Merrill*
3. *en su capacidad de Notario Público, Estado de California*
4. *lleva el sello/timbre de Debra L. Merrill, Notario Público, Estado de California*

CERTIFICADO



5. en Sacramento, California
6. el 9 de noviembre de 2006
7. por el Subsecretario de Estado, Estado de California
8. No. 323785
9. Sello/Timbre: EL GRAN SELLO DEL ESTADO DE CALIFORNIA.
10. Firma (Firma ilegible), Secretario de Estado

Por: [Firma ilegible]

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 10097-704-001-1

WPC 10097 - ID 10

OCT 23/06

Maria E. Martelo
TRADUCCION No.: 15/1106
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia



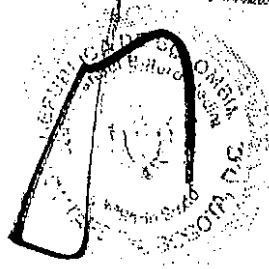
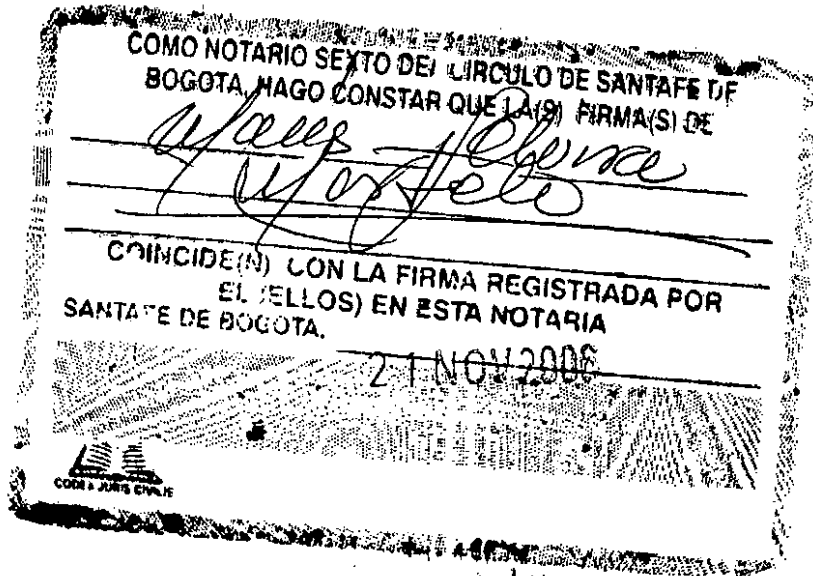
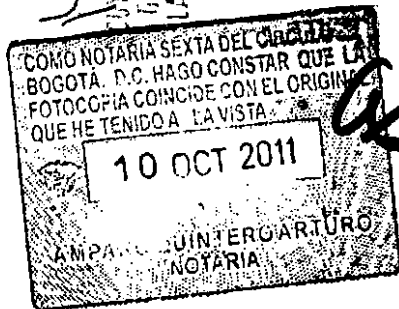
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 NOV 21 P 2:09

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

527255
Pena Valde
CÓPIA FIRMA ADECUADA EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 No. 72 - 35

BOGOTÁ 8, COLOMBIA

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.comTELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

Poderdante : AMGEN FREMONT INC

Poder conferido el : 20/10/2006

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C. **03 NOV 2009**
 Ante el
 NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE
 BOGOTÁ D.C.
 Comparació (eron) *Enilio FERRERO*
Luz Clemencia de Paz.
 Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.
CC 438.091.747 31929
CC 35.456.344 7723.555
 Y declaro(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Enilio Ferrero
Luz Clemencia de Paz



COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
 FOTOCÓPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE HE TENIDO A LA VISTA
10 OCT 2011
 AMPARO QUINTERO ARTURO
 NOTARIA

ANTICUERPOS DIRIGIDOS A c-MET **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- [0001] El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión (scatter factor), es un factor de crecimiento multifuncional que intensifica la transformación y el desarrollo de tumores mediante la inducción de mitogénesis y motilidad celular. Además, el HGF promueve metástasis mediante la estimulación de la motilidad e invasión celular a través de varias rutas de señalización.
- [0002] Para producir efectos celulares, el HGF debe ligarse a su receptor, c-Met, una tirosina quinasa receptora. La c-Met es una proteína heterodimérica ampliamente expresada que comprende una subunidad α de 50 kilodalton (kDa) y una subunidad β de 145 kDa (Maggiore et al., *J. Cell Physiol*, 173:183-186 (1997)). La subunidad β de c-Met comprende el dominio de tirosina quinasa y dos sitios de autofosforilación, Y1349 e Y1356, que son críticos para la transmisión de la señal del HGF (Maggiore et al., *J. Cell Physiol*, 173:183-186 (1997); Ponzetto et al., *Cell*, 77:2610271 (1994); Maina et al., *Cell*, 87:531-542 (1996)).
- [0003] La ligadura del HGF a la c-Met resulta en la activación de varias rutas de señalización que resulta en varias actividades celulares asociadas con enfermedades similares a cáncer. Estas actividades incluyen promover mitogénesis, supervivencia celular, motilidad celular, invasión de la matriz extracelular (ECM), angiogénesis y metástasis, actividades que todas estimulan la transformación y progresión de enfermedades (Jeffers et al., *J. Mol. Med.*, 74:505-513 (1996); Amicone et al., *EMBO J.*, 16:495-503 (1997); Matsumoto and Nakamura, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 239: 639-644 (1997); Corps et al., *Int. J. Cancer*, 73:151-155 (1997)). La expresión o sobreexpresión de ambos, HGF y c-Met, puede resultar en la transformación morfológica y tumorigenicidad de varios tipos celulares (Jeffers et al., *J. Mol. Med.*, 74:505-513 (1996). La expresión o sobreexpresión de HGF y c-Met también promueve mitogénesis y crecimiento independiente de anclaje (Rubin et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88:514-419 (1991); Kan et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174:331-337 (1991). En particular, se ha informado sobre la invasión de la matriz extracelular (ECM) cuando la activación de c-Met causa la expresión de proteasas, tales como el activador de plasminógeno similar a uroquinasa y la colegenasa, permitiendo que las células se degraden e invadan localmente el tejido (Jeffers et al., *J. Mol. Med.*, 74:505-513 (1996). Además, varios tumores que expresan o sobreexpresan solamente c-Met, y no HGF, utilizan un mecanismo de señalización paracrino en vez de un mecanismo de señalización autocrino para sustentar la tumorigénesis (Beviglio et al., *Int. J. Cancer*, 74:301-309 (1997).
- [0004] HGF y c-Met también han sido implicados en la etiología de muchos cánceres humanos. Se observó expresión o sobreexpresión concomitante de HGF y c-Met en carcinoma de mama (Nagy et al., *Surg. Oncol.*, 5:15-21 (1996); Tuck et al., *Am. J. Pathol.*, 148:225-232 (1996), carcinoma pancreático (Ebert et al., *Cancer Res.*, 54:5775-5778 (1994), carcinoma oral de células escamosas (Marshall and Kornberg, *Laryngoscope*, 108:1413-1417 (1998), gliomas (Koochekpour et al., *Cancer Res.*, 57:5391-5398 (1997) y mesoteliomas pleurales malignos (Tolpay et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124:291-296 (1998); Klotz et al., *Intl. J. Cancer*, 76:240-249 (1998)). Además, la sobreproducción de c-Met puede ser importante en el desarrollo de otros tumores en los cuales debe verificarse todavía un rol para HGF. Estos cánceres incluyen carcinoma hepatocelular (Suzuki et al., *Hepatology*, 20:1231-1236 (1996), carcinoma celular renal (Natali et al., *Intl. J. Cancer*, 69:212-217 (1996), carcinoma pulmonar (Harvey et al., *J. Pathol.*, 180:389-394 (1996), cáncer de ovarios (Nagy et al., *J. Surg. Oncol.*, 60:95-99 (1995), carcinoma gástrico (Taniguchi et al., *Cancer*, 82:2112-2122 (1998) y carcinoma colorectal (Hiscox et al., *Cancer Invest.*, 15:513-521 (1997). Además, se informó sobre mutaciones de la línea germinal y somáticas que activan el receptor c-Met en ausencia de HGF en individuos con carcinomas renales papilares (Schmidt et al., *Nat. Genet.*, 16:68-73 (1997); Jeffers et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94:11445-11450 (1997)). Se han detectado en individuos con c-Met otros carcinomas, incluyendo aquellos de estómago, recto, pulmón, páncreas, mamas y ducto biliar que contienen mutaciones activantes (Zbar et al., *J. Urol.*, 151:561-566 (1994).
- [0005] Se necesita una estrategia para inhibir la ligadura de c-Met para prevenir la activación de rutas que conducen a enfermedades tales como cáncer. Tal estrategia puede atenuar la activación de c-Met y/o las respuestas biológicas inducidas por HGF (Date et al., *FEBS Letters*, 420:1-6 (1997); (Kaji et al., *Cancer Gene Ther.*, 3:393-404 (1996); (Li et al., *Clin. Exp. Metastasis*, 16:74-82 (1998)) e inhibir, por lo tanto, la progresión de tumores. Si bien se

informó sobre anticuerpos monoclonales anti-c-Met de ratón que tienen actividad anti-mitogénica en cultivos celulares (US 5646036, US 6207152, US 6214344), un anticuerpo de ratón no puede usarse fácilmente para tratar pacientes humanos. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones mejoradas que ligarán c-Met y que pueden ser usadas, por ejemplo, para inhibir el crecimiento de tumores dependientes de HGF y c-Met mediante la inhibición de mitogénesis, invasión, metástasis y/o supervivencia.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención provee un anticuerpo aislado o una porción que liga antígeno del mismo que liga específicamente c-Met y actúa predominantemente como un antagonista de c-Met y, en algunos casos, como un anticuerpo agonista de c-Met y composiciones que comprenden dicho anticuerpo o dicha porción.

[0007] La invención provee una composición que comprende un anticuerpo anti-c-Met de la invención, la cadena pesada y/o liviana del mismo, los dominios variables o las porciones que ligan antígeno del mismo, o moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo, una cadena del anticuerpo o un dominio variable del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención pueden comprender además otro componente, tal como un agente terapéutico o un agente diagnóstico. La invención también provee métodos diagnósticos y terapéuticos.

[0008] La invención provee además una línea celular aislada, que produce un anticuerpo anti-c-Met o una porción que liga antígeno del mismo.

[0009] La invención también provee moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo anti-c-Met, los dominios variables del mismo o porciones que ligan antígeno del mismo.

[0010] La invención provee vectores y células hospedantes que comprenden las moléculas de ácido nucleico, como así también métodos para producir recombinantemente los polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico.

[0011] También se proveen animales o plantas transgénicos no humanos que expresan la cadena pesada y/o liviana, o porciones que ligan antígeno de las mismas, de un anticuerpo anti-c-Met.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0012] Las Figuras 1A y 1B muestran que los anticuerpos anti-c-Met inhiben la ligadura del ligando con una proteína aislada ECD/Fc de c-Met e inhiben la fosforilación de c-Met en células después de la estimulación con HGF.

[0013] La Figura 1A es un gráfico que ilustra la inhibición de la ligadura del ligando con anticuerpos monoclonales anti-c-Met de la invención. Los anticuerpos monoclonales anti-c-Met 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T y 13.3.2 se ligan al receptor c-Met e inhiben la ligadura del HGF.

[0014] La Figura 1B es un gráfico que ilustra la inhibición en un ensayo ELISA de fosforilación de c-Met. Los anticuerpos monoclonales anti-c-Met 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T y 13.3.2 inhiben la fosforilación de la tirosina de c-Met, según lo medido por un ensayo ELISA de fosforilación de c-Met en células después de la estimulación con HGF.

[0015] La Figura 2 es un gráfico que ilustra la especificidad de un anticuerpo monoclonal anti-c-Met. Los anticuerpos monoclonales anti-IGF-1R 2.13.2 y 2.12.1 se ligan con IGF-1R y causan una disminución de la fosforilación de la tirosina de la IGF-1R después del tratamiento con IGF-1. Los anticuerpos anti-c-Met 9.1.2 y 13.3.2 no se ligan con IGF-1R, aún con concentraciones elevadas del anticuerpo, y no causan una disminución de la fosforilación de la tirosina de la IGF-1R.

[0016] Las Figuras 3A-3H muestran alineaciones de las secuencias de aminoácidos previstas de los dominios variables de cadena liviana y pesada de cuatro anticuerpos anti-c-Met en comparación con las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de los genes humanos correspondientes. Las diferencias entre las secuencias del anticuerpo y la secuencia de la línea germinal se indican mediante el sombreado de las secuencias del anticuerpo. Las secuencias subrayadas en cada alineación representan, de izquierda a derecha, el péptido señal y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la línea germinal.

[0017] La Figura 3A muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana para el anticuerpo 13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X₈ es alanina) y la variante 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X₈ es treonina) con la secuencia de la línea germinal L5V_k1, J_k4 (SEQ ID NO: 17).

[0018] La Figura 3B muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana para el anticuerpo 9.1.2 (SEQ ID NO: 8) con la secuencia de la línea germinal A27Vk3, Jk2 (SEQ ID NO: 18).

[0019] La Figura 3C muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana para el anticuerpo 8.70.2 (SEQ ID NO: 12) con la secuencia de la línea germinal L5Vk1, Jk3 (SEQ ID NO: 19).

[0020] La Figura 3D muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena liviana para el anticuerpo 8.90.3 (SEQ ID NO: 16) con la secuencia de la línea germinal L5Vk1, Jk1 (SEQ ID NO: 20).

[0021] La Figura 3E muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos previstas de la cadena pesada del anticuerpo 13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina y X₆ es alanina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina y X₆ es alanina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina y X₆ es alanina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina y X₆ es prolina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina y X₆ es prolina); y 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina y X₆ es prolina) con la línea germinal V_H 1-18, D2-15, secuencia J_H4b (SEQ ID NO: 21).

[0022] La Figura 3F muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 9.1.2 (SEQ ID NO: 6) con la secuencia de la línea germinal V_H 4-31, D2-2, D7-27, J_H6b (SEQ ID NO: 22).

[0023] La Figura 3G muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 8.70.2 (SEQ ID NO: 10) con la secuencia de la línea germinal V_H 4-39, D2-2, J_H4b (SEQ ID NO: 23).

[0024] La Figura 3H muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de la cadena pesada para el anticuerpo 8.90.3 (SEQ ID NO: 14) con la secuencia de la línea germinal V_H 3-48, 4-17, J_H4b (SEQ ID NO: 24).

[0025] Las Figuras 4A-4E muestran que anticuerpos anti-c-Met inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*. Las flechas a lo largo del eje x representan las dosis de anticuerpo anti-c-Met administradas.

[0026] La Figura 4A muestra los resultados de un experimento que demuestra que anticuerpos anti-c-Met inhiben el crecimiento de tumores 3T3-S114.

[0027] La Figura 4B muestra los resultados de un experimento que demuestra que anticuerpos anti-c-Met inhiben el crecimiento de tumores U87.

[0028] La Figura 4C muestra los resultados de un experimento que demuestra que anticuerpos anti-c-Met inhiben el crecimiento de tumores A549.

[0029] La Figura 4D muestra los resultados de un experimento que demuestra que anticuerpos anti-c-Met inhiben el crecimiento de tumores GTL-16.

[0030] La Figura 4E muestra los resultados de un experimento que demuestra que el anticuerpo anti-c-Met 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T inhibe el crecimiento de tumores U87 de un modo dependiente de la dosis.

[0031] La Figura 5 muestra la relación entre los niveles en suero del anticuerpo anti-c-Met 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T y la inhibición de la actividad c-Met. La Figura 5 también muestra la relación entre los niveles en suero del anticuerpo anti-c-Met 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T y la disminución de la actividad de c-Met en tumores U87.

[0031a] Las Figuras 6A-6P ilustran nucleótidos de longitud completa, de cadena pesada y liviana y secuencias de aminoácidos predecidas de cuatro anticuerpos anti-c-Met. El péptido señalizador para cada secuencia de cadena pesada y liviana es designado por letras minúsculas subrayadas. Las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 para cada secuencia pesada o liviana son designadas con letras mayúsculas subrayadas. El dominio variable para cada secuencia es designado con letras mayúsculas. La región constante para cada secuencia es designada con letras minúsculas.

[0031b] La Figura 6A muestra la secuencia de ADN de Cadena Pesada 13.3.2 (SEQ. ID NO: 1).

[0031c] La Figura 6B muestra la secuencia de proteína de Cadena Pesada 13.3.2 (SEQ. ID NO: 2).

[0031d] La Figura 6C muestra la secuencia de ADN de Cadena Liviana 13.3.2 [Cadena Kappa] (SEQ. ID NO: 3).

[0031e] La Figura 6D muestra la secuencia de proteína de Cadena Liviana 13.3.2 [Cadena Kappa] (SEQ. ID NO: 4).

[0031f] La Figura 6E muestra la secuencia de ADN de Cadena Pesada 9.1.2 0 (SEQ. ID NO: 5).

[0031g] La Figura 6F muestra la secuencia de proteína de Cadena Pesada 9.1.2 (SEQ. ID NO: 6).

[0031h] La Figura 6G muestra la secuencia de ADN de Cadena Liviana 9.1.2 [Cadena Kappa] (SEQ. ID NO: 7).

[0031i] La Figura 6H muestra la secuencia de proteína de Cadena Liviana 9.1.2 (SEQ. ID NO: 8).

[0031j] La Figura 6I muestra la secuencia de ADN de Cadena Pesada 8.70.2 (SEQ. ID NO: 9).

[0031k] La Figura 6J muestra la secuencia de proteína de Cadena Pesada 8.70.2 (SEQ. ID NO: 10).

[0031l] La Figura 6K muestra la secuencia de ADN de Cadena Liviana 8.70.2 [Kappa] (SEQ. ID NO: 11).

[0031m] La Figura 6L muestra la secuencia de proteína de Cadena Liviana 8.70.2 [Kappa] (SEQ. ID NO: 12).

[0031n] La Figura 6M muestra la secuencia de ADN de Cadena Pesada 8.90.3 (SEQ. ID NO: 13).

[0031o] La Figura 6N muestra la secuencia de proteína de Cadena Pesada 8.90.3 (SEQ. ID NO: 14).

[0031p] La Figura 6O muestra la secuencia de ADN de Cadena Liviana 8.90.3 [Kappa] (SEQ. ID NO: 15).

[0031q] La Figura 6P muestra la secuencia de proteína de Cadena Liviana 8.90.3 (SEQ. ID NO: 16).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definición y técnicas generales

[0032] Salvo que se indique lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención deben tener los significados entendidos comúnmente por los entendidos en el arte. Además, siempre que el contexto no requiera lo contrario, los términos en singular deben incluir el plural y los términos en plural deben incluir el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo celular y de tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en ésta son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en el arte.

[0033] Los métodos y las técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y según lo descrito en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas en toda la presente memoria descriptiva, siempre que no se indique lo contrario. Vea, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), incorporados en ésta por referencia. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, según lo realizado comúnmente en el arte o de acuerdo con lo descrito en ésta. La nomenclatura usada en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritos en ésta son aquellos bien conocidos y usados comúnmente en el arte. Se usan técnicas estándar para síntesis química, análisis químicos, preparaciones farmacéuticas, formulaciones, administración y tratamiento de pacientes.

[0034] Los términos siguientes, salvo indicación en contrario, deben entenderse con los significados siguientes:

[0035] El término "polipéptido" comprende proteínas naturales o artificiales, fragmentos proteicos y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

[0036] El término "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" significa una proteína, polipéptido o anticuerpo que debido a su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con componentes que lo acompañan en su estado natural, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente o (4) no se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la cual se origina naturalmente estará "aislado" de los componentes con los que está asociado naturalmente. Una proteína también puede convertirse en una proteína substancialmente libre de componentes con los cuales está asociada naturalmente mediante una aislación, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en el arte.

[0037] Ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo anti-c-Met que ha sido purificado por afinidad usando c-Met, un anticuerpo anti-c-Met que ha sido sintetizado *in vitro* mediante un hibridoma u otra línea celular y un anticuerpo anti-c-Met derivado de un ratón transgénico.

[0038] Una proteína o un polipéptido es "substancialmente puro", "substancialmente homogéneo" o "substancialmente purificado" cuando al menos aproximadamente 60 a 75% de

una muestra exhibe una sola especie de polipéptido. El polipéptido o la proteína puede ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o proteína substancialmente puro comprenderá típicamente aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra protéica, más usualmente aproximadamente 95%, y preferentemente tendrá una pureza mayor de 99%. La pureza u homogeneidad de la proteína puede ser indicada por un número de medios bien conocidos en el arte, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguida por la visualización de una sola banda del polipéptido al colorear el gel con un colorante bien conocido en el arte. Para ciertos propósitos, puede proveerse una resolución mayor usando HPLC u otros medios de purificación bien conocidos en el arte.

[0039] El término "fragmento de polipéptido", según lo usado en ésta, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero cuya secuencia de aminoácidos remanente es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de ocurrencia natural. En algunas realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos. En otras realizaciones, los fragmentos tienen una longitud de al menos 14, al menos 20, al menos 50 o al menos 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos.

[0040] El término "análogo polipeptídico", según lo usado en ésta, se refiere a un polipéptido que comprende un segmento substancialmente idéntico a una porción de una secuencia de aminoácidos y que tiene al menos una de las propiedades siguientes: (1) ligadura específica a c-Met bajo condiciones de ligadura adecuadas, (2) capacidad para inhibir o activar c-Met. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución (o inserción o delección) con aminoácidos conservativos con respecto a la secuencia que ocurre naturalmente.

Análogos típicos tienen una longitud de al menos 20 ó 25 aminoácidos, preferentemente al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos o mayor, y muchas veces pueden tener la longitud del polipéptido de longitud completa. Algunas realizaciones de la invención incluyen fragmentos polipeptídicos o anticuerpos análogos a polipéptidos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 substituciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal.

[0041] En ciertas realizaciones, las substituciones de aminoácidos de un anticuerpo anti-c-Met o una porción que liga antígeno del mismo son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a oxidación, (3) modifican la afinidad de ligadura para formar complejos proteicos y (4) confieren o modifican otras propiedades físicoquímicas o funcionales de tales análogos, pero todavía retienen ligadura específica a c-Met. Los análogos pueden incluir varias mutaciones de una secuencia diferente a la secuencia peptídica que ocurre normalmente. Por ejemplo, en la secuencia que ocurre normalmente pueden realizarse substituciones simples o múltiples de aminoácidos, preferentemente substituciones con aminoácidos conservativos, preferentemente en la porción del polipéptido fuera del dominio (de los dominios) que forma(n) contactos intermoleculares. Una substitución con un aminoácido conservativo no debe modificar substancialmente las características estructurales de la secuencia parental; por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería modificar la lámina $\square$ antiparalela que integra el dominio de ligadura de la inmunoglobulina que ocurre en la secuencia parental, ni debe romper otros tipos de estructura secundarias que caracterizan la secuencia parental. Generalmente, no se usarán glicina y prolina en una lámina $\square$ antiparalela. Ejemplos de estructuras polipeptídicas secundarias y terciarias reconocidas por el arte se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton et al., *Nature* 354:105 (1991), incorporados en ésta por referencia.

[0042] Análogos no peptídicos son usados comúnmente en la industria farmacéutica como drogas con propiedades análogas a aquellas del péptido molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se llaman "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger, *TINS* p.392 (1985); y Evans et al., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987), incorporados en ésta por referencia. Tales compuestos son desarrollados muchas veces con la ayuda de un modelaje molecular computarizado. Los peptidomiméticos estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tal como un anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace

seleccionado del grupo formado por: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH--(cis y trans), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂--, y --CH₂SO--, por métodos bien conocidos en el arte. También puede usarse la substitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina), para generar péptidos más estables. Además, péptidos minimizados (constrained peptides) que comprenden una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados por métodos conocidos en el arte (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), incorporado en ésta por referencia); por ejemplo, agregando residuos internos de cisteína capaces de formar puentes intramoleculares de disulfuro que ciclizan el péptido.

[0043] Cuando en ésta se hace referencia a un "anticuerpo de acuerdo con la invención", se entiende normalmente que también puede usarse una porción que liga antígeno del mismo. Una porción que liga antígeno compite con el anticuerpo intacto por la ligadura específica. Vea en general, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Pueden producirse porciones que ligan antígeno mediante técnicas de DNA recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunas realizaciones, las porciones que ligan antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb y fragmentos de regiones determinantes complementarias (CDR), anticuerpos de cadena simple (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo suficiente para conferir al polipéptido ligadura a un antígeno específico.

[0044] Desde el terminal N hasta el terminal C, los dominios variables de ambas, la cadena liviana y la cadena pesada maduras, comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza en ésta de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) o Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

[0045] Según lo usado en ésta, un anticuerpo al cual se hace referencia mediante un número es igual al anticuerpo monoclonal obtenido a partir del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 13.3.2 es el mismo anticuerpo que el obtenido a partir del hibridoma 13.3.2, o un subclon del mismo.

[0046] De acuerdo con lo usado en ésta, un fragmento Fd significa un fragmento de anticuerpo que consiste de los dominios V_H y C_H1; un fragmento Fv consiste de los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)) consiste de un dominio V_H.

[0047] En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple (scFv) en el cual una región V_L y una región V_H están apareadas para formar una molécula monovalente vía un engarce sintético que permite fabricar a las regiones como una sola cadena protéica. (Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988).) En algunas realizaciones, los anticuerpos son diacuerpos, es decir, son anticuerpos bivalentes en los cuales dominios V_H y V_L son expresados sobre una sola cadena polipéptida, pero usando un engarce demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, forzando los dominios de este modo a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de ligadura de antígeno. (Vea, por ejemplo, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), y Poljak R. J. et al., *Structure* 2:1121-1123 (1994).) En algunas realizaciones, pueden incorporarse uno o más CDRs de un anticuerpo de la invención en una molécula, ya sea covalentemente o no covalentemente, para trasformarla en una inmunoadhesina que se liga específicamente a c-Met. En tales realizaciones, la CDR(s) pueden incorporarse como parte de una cadena polipéptida más larga, pueden ligarse covalentemente a otra cadena polipéptida o pueden incorporarse no covalentemente.

[0048] En realizaciones que tienen uno o más sitios de ligadura, estos pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes.

[0049] Según lo usado en ésta, el término "anticuerpo humano" significa cualquier anticuerpo en el cual las secuencias de los dominios variable y constante son secuencias humanas. El término comprende anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, pero que han sido cambiadas, por ejemplo, para disminuir inmunogenicidad posible, aumentar afinidad, eliminar cisteínas que podrían causar un plegado indeseable, etc. El término comprende tales

anticuerpos producidos recombinantemente en células no humanas, que podrían impartir glicosilación no típica de células humanas. Estos anticuerpos pueden prepararse de varios modos, como descrito más abajo.

[0050] El término "anticuerpo quimérico", según lo usado en ésta, significa un anticuerpo que comprende regiones de dos o más anticuerpos diferentes. En una realización, una o más de las CDRs del anticuerpo quimérico se derivan de un anticuerpo anti-c-Met humano. En otra realización, todas las CDRs se derivan de un anticuerpo anti-c-Met humano. En otra realización, las CDRs de más de un anticuerpo anti-c-Met humano se encuentran combinadas en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena liviana de un primer anticuerpo anti-c-Met humano, una CDR2 de la cadena liviana de un segundo anticuerpo anti-c-Met humano y una CDR3 de una cadena liviana de un tercer anticuerpo anti-c-Met humano, y CDRs de la cadena pesada pueden derivarse de uno o más otros anticuerpos anti-c-Met diferentes. Además, las regiones framework pueden estar derivadas de uno de los anticuerpos anti-c-Met del cual se tomaron una o más de las CDRs o de uno o más anticuerpos humanos diferentes.

[0051] En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico de la invención es un anticuerpo anti-c-Met humanizado. Un anticuerpo anti-c-Met humanizado de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de una o más regiones framework y/o la secuencia de aminoácidos de al menos una porción de la región constante de uno o más anticuerpos anti-c-Met humanos de la invención y CDRs derivadas de un anticuerpo anti-c-Met no humano.

[0052] Un "anticuerpo activante" (al cual también se hace referencia en ésta como "anticuerpo agonista"), según lo usado en ésta, significa un anticuerpo que aumenta una o más actividades de c-Met en al menos 40% al ser agregado a una célula, tejido u organismo que expresa c-Met. En algunas realizaciones, el anticuerpo activa la actividad c-Met en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o mayor de 100%. En algunas realizaciones, el anticuerpo activante se agrega en presencia de HGF. En algunas realizaciones, un anticuerpo agonista de la invención aumenta al menos una actividad de c-Met 10 veces.

[0053] Los fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina pueden ser preparados fácilmente por los entendidos en el arte siguiendo las enseñanzas de esta memoria descriptiva. Los terminales amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos se encuentran cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los datos de las secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con los datos de bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferentemente, se usan métodos de comparación computarizados para identificar motivos secuenciales o dominios previstos de conformación protéica que se encuentran en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias protéicas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Vea Bowie et al., *Science* 253:164 (1991).

[0054] El término "resonancia en la superficie de un sensor recubierto con la muestra" (surface plasmon resonance), según lo usado en ésta, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecífica en tiempo real mediante la detección de alteraciones de concentraciones protéicas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, vea Jonsson U. et al., *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Jonsson U. et al., *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Jonsson B. et al., *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); y Johnsson B. et al., *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

[0055] El término " K_D " se refiere a la constante del equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

[0056] El término "epítotope" incluye un determinante proteico capaz de ligarse específicamente a un receptor de inmunoglobulina o célula T o de interactuar de otro modo con una molécula. Los determinantes epitópicos consisten generalmente de grupos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de hidratos de carbono o azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, como así también características de carga específicas. Un epítotope puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítotope lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula interactuante (tal como un anticuerpo) se encuentran linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítotope conformacional, los puntos de interacción se encuentran a través de residuos de aminoácidos sobre la proteína

separados entre sí. Se dice que un anticuerpo se liga específicamente con un antígeno si la constante de disociación es ≤ 1 mM, preferentemente ≤ 100 nM y más preferentemente ≤ 10 nM. En ciertas realizaciones, la K_D es de 1 pM a 500 pM. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 500 pM y 1 μ M. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 1 μ M y 100 nM. En otras realizaciones, la K_D se encuentra entre 100 mM y 10 nM. Una vez determinado un epítipo o antígeno deseado, es posible generar anticuerpos contra dicho epítipo, por ejemplo, usando las técnicas descritas en la presente invención. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede elucidar información sobre epítopos deseables. Luego, a partir de esta información, es posible rastrear anticuerpos que se ligan competitivamente al mismo epítipo. Un enfoque para lograr esto es conducir estudios de competición cruzada para encontrar anticuerpos que compiten entre sí por ligaduras, por ejemplo los anticuerpos compiten para ligarse al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para anticuerpos "ligantes" en base a su competición cruzada se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 03/48731.

[0057] Según lo usado en ésta, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaciones siguen el uso convencional. Vea Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), incorporado en ésta por referencia.

[0058] El término "polinucleótido" según lo referido en ésta, significa una forma polimérica de nucleótidos de una longitud de al menos 10 bases, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra simple y de hebra doble.

[0059] El término "polinucleótido aislado", según lo usado en ésta, significa un polinucleótido de origen genómico, cDNA, u origen sintético o alguna combinación de los mismos, que debido a su origen de "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo el polinucleótido o una porción del mismo con el cual se encuentra en la naturaleza, (2) está ligado operativamente a un polinucleótido al cual no está ligado en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

[0060] El término "nucleótidos que se encuentran naturalmente", según lo usado en ésta, incluye desoxiribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados", según lo usado en ésta, incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" referido en ésta incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Vea, por ejemplo, LaPlanche et al., *Nucl Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec et al., *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein et al., *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon et al., *Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90:543 (1990), cuyas revelaciones están incorporadas en ésta por referencia. Si deseado, un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección.

[0061] Secuencias "enlazadas operativamente" incluyen ambas, secuencias de control de expresión que se encuentran en posición contigua con el gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de expresión", según lo usado en ésta, significa secuencias polinucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificadoras a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias de iniciación de la transcripción, terminación, promotoras e intensificadoras adecuadas; señales de procesamiento de RNA eficientes, tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplasmático; secuencias que aumentan la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso de Kozak); secuencias que aumentan la estabilidad de la proteína; y, si deseado, secuencias que aumentan la secreción de la proteína. La naturaleza de tales secuencias de control difiere en dependencia del organismo hospedante; en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente el promotor, el sitio de ligadura ribosomal y la secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y la secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" tiene la intención de incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia

es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir también componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras y secuencias de compañero de fusión.

[0062] El término "vector", según lo usado en ésta, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido ligada. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido, es decir, una pieza circular de hebra doble de DNA a la cual pueden ligarse segmentos adicionales de DNA. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, al cual pueden ligarse segmentos de DNA adicionales en el genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la cual son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores mamíferos episomales). En otras realizaciones, los vectores (por ejemplo, vectores mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedante al ser introducidos en la célula hospedante, y de ese modo son replicados conjuntamente con el genoma del hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están ligados operativamente. A tales vectores se hace referencia en ésta como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión").

[0063] El término "célula hospedante recombinante" (o simplemente "célula hospedante"), según lo usado en ésta, significa una célula en la cual ha sido introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que los términos "célula hospedante recombinante" y "célula hospedante" no significan solamente la célula objeto particular sino también la progenie de tal célula. Como pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas, debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie, de hecho, puede ser no idéntica a la célula parental, pero aún estar incluida dentro del alcance del término "célula hospedante" usado en ésta.

[0064] El término "hibridar selectivamente" referido en ésta significa ligar en forma detectable y específica. Polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación y lavado que minimizan la ligadura detectable de cantidades apreciables a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de "elevada severidad" o "altamente estrictas" para lograr condiciones de hibridación selectiva, condiciones que son conocidas en el arte y discutidas en ésta. Un ejemplo de condiciones de "elevada severidad" o "altamente estrictas" es la incubación de un polinucleótido con otro polinucleótido, donde un polinucleótido puede ser fijado a una superficie sólida, tal como una membrana, en un buffer de hibridación de SSPE o SSC 6X, formamida al 50%, reactivo de Denhardt 5X, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado a una temperatura de hibridación de 42°C durante 12-16 horas, seguido por dos lavados a 55°C, usando un buffer de lavado de SSC 1X, SDS al 0,5%. Vea también Sambrook et al., supra, pp. 9.50-9.55.

[0065] El término "porcentaje de identidad de secuencias", en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos, se refiere a los residuos de las dos secuencias que son iguales cuando las secuencias son alineadas para su máxima correspondencia. La longitud de la secuencia en la cual se compara la identidad puede tener una extensión de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más usualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos y preferentemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. En el arte se conoce un número de algoritmos diferentes que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, secuencias de polinucleótidos pueden ser comparadas usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas de la versión 10.0 del paquete de software Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, provee alineamientos y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones que presentan la mejor superposición entre las secuencias problema y de referencia (between the query and search sequences) (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); incorporados en ésta por referencia). Siempre que no sea especificado de otro modo, se usan parámetros predeterminados para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el

porcentaje de identidad de secuencias entre ácidos nucleicos puede ser determinado usando FASTA con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntaje) o usando Gap con sus parámetros predeterminados provistos en la versión 6.1 de GCG, incorporada en ésta por referencia.

[0066] Una referencia a una secuencia nucleotídica comprende su complemento, siempre que no sea especificado de otro modo. Por lo tanto, debe entenderse que una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular comprende su hebra complementaria, que es su secuencia complementaria.

[0067] Según lo usado en ésta, los términos "porcentaje de identidad de secuencias" y "porcentaje de homología de secuencias" se usan en forma intercambiable.

[0068] El término "similitud substancial" o "similitud substancial de secuencias", al hacer referencia a un ácido nucleico o un fragmento del mismo, indica que al estar alineado el ácido nucleico óptimamente, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados, con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe una identidad de secuencias de nucleótidos en al menos aproximadamente 85%, preferentemente al menos aproximadamente 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido para determinar la identidad de secuencias, tales como FASTA, BLAST o Gap, discutidos precedentemente.

[0069] Cuando se aplica a polipéptidos, el término "identidad substancial" significa que cuando dos secuencias peptídicas son alineadas óptimamente, tal como por el programa GAP o BESTFIT, usando pesos predeterminados del intervalo no homólogo (GAP), comparten una identidad de secuencias de al menos 70%, 75% y 80%, preferentemente al menos una identidad de secuencias de 90% ó 95%, y más preferentemente una identidad de secuencia de al menos 97%, 98% ó 99%. En ciertas realizaciones, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren en sustituciones con aminoácidos conservativos. Una "substitución con un aminoácido conservativo" es una sustitución en la cual un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución con un aminoácido conservativo no cambiará substancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los cuales dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencias puede ser ajustado hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los entendidos en el arte. Vea, por ejemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxil-alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptofano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Grupos de sustitución de aminoácidos conservativos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina.

[0070] Alternativamente, un reemplazo conservativo es cualquier cambio que tiene un valor positivo en la matriz de semejanza algorítmica (log-likelihood matrix) PAM250 revelada en Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992), incorporado en ésta por referencia. Un reemplazo "moderadamente conservativo" es cualquier cambio que tiene un valor no negativo en la matriz de semejanza logarítmica PAM250.

[0071] La identidad de secuencias para polipéptidos se mide típicamente usando software para análisis de secuencias. Un software para análisis de proteínas compara secuencias usando medidas de similitud asignadas a varias sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones con aminoácidos conservativos. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit" que pueden usarse con parámetros predeterminados por los programas para determinar homología de secuencias o identidad de secuencias entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies y organismos, o entre una proteína natural y una mutación de la misma. Vea, por ejemplo, GCG, versión 6.1 (University of Wisconsin, WI). Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA con parámetros predeterminados o recomendados, vea GCG, versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y

FASTA3) provee alineaciones y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones que presentan la mejor superposición entre las secuencias problema y de referencia (between the query and search sequences) (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* Otro algoritmo preferido, al comparar una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos, es el programa de computación BLAST, especialmente blastp o tblastn, usando parámetros predeterminados provistos con el programa. Vea, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

[0072] La longitud de las secuencias polipeptídicas cuya homología se compara será generalmente de al menos aproximadamente 16 residuos de aminoácidos, usualmente al menos aproximadamente 20 residuos, más usualmente al menos aproximadamente 24 residuos, típicamente al menos aproximadamente 28 residuos, y preferentemente mayor de aproximadamente 35 residuos. Cuando se investiga en una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es preferible comparar secuencias de aminoácidos.

[0073] De acuerdo con lo usado en ésta, los términos "marcador" o "marcado" se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En una realización, el marcador es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido con marcador radioactivo o fijación de grupos de biotín a un polipéptido, grupos que pueden ser detectados por avidina marcada (por ejemplo, streptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede ser detectada por métodos ópticos o colorimétricos). En otra realización, la etiqueta o marcador puede ser terapéutico, por ejemplo, un conjugado de droga o toxina. En el arte se conocen varios métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas que pueden usarse. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: radioisótopos o radionuclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, sustancias fosforescentes a base de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, α -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotín, epítopes polipeptídicos predeterminados reconocidos por un reporter secundario (por ejemplo, secuencias apareadas de cierres de leucina (leucine zipper pair sequences), sitios de ligadura para anticuerpos secundarios, dominios que ligan metales, rótulos de epítopes), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tal como toxina pertusis, taxol, citocalacina B, gramicidina D, bromuro de etilio, hemetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colquicina, toxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, los marcadores están unidos mediante brazos espaciadores de longitud variable para reducir el potencial de impedimento estérico.

[0074] Se entenderá que en toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo" implicará la inclusión de una entidad o grupo de entidades, pero no la exclusión de cualquier otra entidad o grupo de entidades.

Anticuerpos anti-c-Met humanos y caracterización de los mismos

[0075] En una realización, la invención provee anticuerpos anti-c-Met humanizados. En otra realización, la invención provee anticuerpos anti-c-Met humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-c-Met humanos se producen mediante la inmunización de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un roedor, cuyo genoma comprende genes de inmunoglobulina humana de modo que el animal transgénico produce anticuerpos humanos.

[0076] Un anticuerpo de la invención anti-c-Met puede comprender una cadena liviana kappa humana o una cadena liviana lambda humana o una secuencia de aminoácidos derivada de la misma. En algunas realizaciones que comprenden una cadena liviana kappa, el dominio variable (V_L) de la cadena liviana es codificado en parte por un gen L5 V_{K1} ó A27 V_{K3} humano.

[0077] En algunas realizaciones, el V_L del anticuerpo anti-c-Met comprende una o más substituciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, el V_L del anticuerpo anti-c-Met comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 substituciones de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de la

línea germinal. En algunas realizaciones, una o más de las substituciones de la línea germinal se encuentra en las regiones CDR de la cadena liviana. En algunas realizaciones, las substituciones de aminoácidos con relación a la línea germinal se encuentran en una o más de las mismas posiciones como las substituciones en relación a la línea germinal de uno o más cualesquiera de los V_L de los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T. Por ejemplo, el V_L del anticuerpo anti-c-Met puede contener una o más substituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal como las encontradas en el V_L del anticuerpo 9.1.2., o pueden existir una o más substituciones de aminoácidos en comparación con la línea germinal como las encontradas en el V_L del anticuerpo 13.3.2, que utiliza el mismo gen V_K que el anticuerpo 8.70.2. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos se encuentran en una o más posiciones iguales, pero implican una substitución diferente a aquella encontrada en el anticuerpo de referencia.

[0078] En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos con relación a la línea germinal se producen en una o más posiciones iguales a aquellas encontradas en cualquiera de los V_L de los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T, pero los cambios pueden representar substituciones de aminoácidos conservativos en tal posición (tales posiciones) con relación al aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, si una posición particular en uno de estos anticuerpos se cambia en relación a la línea germinal y es glutamato, puede substituirse por aspartato en esta posición. Similarmente, si una substitución de aminoácido en comparación con la línea germinal es serina, puede substituirse conservativamente la serina por treonina en esta posición. Substituciones con aminoácidos conservativos se discuten *supra*.

[0079] En algunas realizaciones, la cadena liviana del anticuerpo anti-c-Met humano comprende la secuencia de aminoácidos V_L del anticuerpo 13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina); 9.1.2 (SEQ ID NO: 8); 8.70.2 (SEQ ID NO: 12); ó 8.90.3 (SEQ ID NO: 16) ó dicha secuencia de aminoácidos tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 substituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de hasta 3 substituciones con aminoácidos no conservativos. En algunas realizaciones, la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de cualquiera de los anticuerpos precedentes.

[0080] En algunas realizaciones, la cadena liviana puede comprender regiones CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas independientemente de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana, respectivamente de la cadena liviana del anticuerpo 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T, o regiones de CDR que tienen cada una menos de 4 o menos de 3 substituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos substituciones con aminoácidos no conservativos. En algunas realizaciones, la cadena liviana del anticuerpo anti-c-Met comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana, cada una de las cuales es seleccionada independientemente entre las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana del anticuerpo monoclonal 13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina; SEQ ID NO: 3, donde X_7 es guanosina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es trionina; SEQ ID NO: 3, donde X_7 es adenosina); 9.1.2 (SEQ ID NO: 8); SEQ ID NO: 7); 8.70.2 (SEQ ID NO: 12); SEQ ID NO: 11); ó 8.90.3 (SEQ ID NO: 16); SEQ ID NO: 15). En ciertas realizaciones, la cadena liviana del anticuerpo anti-c-Met comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena liviana de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo seleccionado entre 13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 9.1.2 (SEQ ID NO: 8); 8.70.2 (SEQ ID NO: 12); 8.90.3 (SEQ ID NO: 16) ó 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es trionina) o dichas regiones CDR tienen cada una menos de 4 o menos de 3 substituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos substituciones con aminoácidos no conservativos.

[0081] Con respecto a la cadena pesada, en algunas realizaciones, el dominio variable (V_H) es codificado en parte por un gen V_H 1-18, V_H 4-31, V_H 4-39 ó V_H 3-48 humano. En algunas realizaciones, la secuencia V_H del anticuerpo anti-c-Met contiene una o más substituciones, deleciones o inserciones (adiciones) de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, la mutación (las mutaciones) son substituciones no conservativas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, las mutaciones se encuentran en

las regiones CDR de la cadena pesada. En algunas realizaciones, los cambios de aminoácidos se efectúan en una o más de las mismas posiciones como las mutaciones de la línea germinal en uno cualquiera o varios de los V_H de los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T; ó 13.3.2H-A14P,E42K,S97T. En otras realizaciones, los cambios de aminoácidos se efectúan en una o más de las mismas posiciones, pero implican una mutación diferente de aquella en el anticuerpo de referencia.

[0082] En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos V_H del anticuerpo 13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina); 9.1.2 (SEQ ID NO: 6); 8.70.2 (SEQ ID NO: 10) ó 8.90.3 (SEQ ID NO: 14); o dicha secuencia de aminoácidos V_H tiene hasta 1, 2, 3, 4, 6, 8 ó 10 substituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de hasta 3 substituciones con aminoácidos no conservativos. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de cualquiera de los anticuerpos precedentes.

[0083] En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T; ó 13.3.2H-A14P,E42K,S97T o dichas regiones CDR tienen cada una menos de 8, menos de 6, menos de 4 ó menos de 3 substituciones con aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos substituciones con aminoácidos no conservativos.

[0084] En algunas realizaciones, las regiones CDR de la cadena pesada se seleccionan independientemente entre las regiones CDR de dos o más anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T ó 13.3.2H-A14P,E42K,S97T. En otra realización, la cadena pesada comprende regiones CDR seleccionadas independientemente entre dos o más regiones V_H seleccionadas entre 13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina); 9.1.2 (SEQ ID NO: 6); 8.70.2 (SEQ ID NO: 10) ó 8.90.3 (SEQ ID NO: 14). En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana como arriba expuesta y una cadena pesada como arriba expuesta. En una realización adicional, las CDRs de cadena liviana y las CDRs de cadena pesada son del mismo anticuerpo.

[0085] Un tipo de substitución de aminoácidos que puede efectuarse es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que pueden ser químicamente reactivas, por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. En una realización, se efectúa una substitución de una cisteína no canónica. La substitución puede efectuarse en una región CDR o framework de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la cisteína es canónica.

[0086] Otro tipo de substitución de aminoácidos que puede efectuarse es cambiar cualquier sitio proteolítico potencial en el anticuerpo. Tales sitios pueden encontrarse en una región CDR o framework de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La substitución de residuos de cisteína y la eliminación de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de cualquier heterogeneidad en el producto de anticuerpo y aumentar de este modo su homogeneidad. Otro tipo de substitución de aminoácidos consiste en eliminar pares de asparagina-glicina, que forman sitios potenciales de deamidación, modificando uno o ambos residuos.

[0087] En algunas realizaciones, se desdobra la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-c-Met de la invención. En varias realizaciones de la invención, las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos anti-c-Met pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

[0088] En un aspecto, la invención se refiere a cuatro anticuerpos monoclonales anti-c-Met humanos inhibitorios y a las líneas celulares de hibridoma que los producen. La Tabla 1 enumera los identificadores de secuencia (SEQ ID NOs:) de los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y liviana de longitud completa (incluyendo la secuencia conductora), y las secuencias de aminoácidos deducidas de longitud completa.

Tabla 1
ANTICUERPOS ANTI-c-Met HUMANOS

Anticuerpo monoclonal	IDENTIFICADOR DE SECUENCIAS (SEQ ID NO:)			
	Longitud completa			
	Pesada		Liviana	
	DNA	Proteína	DNA	Proteína
13.3.2	1	2	3	4
9.1.2	5	6	7	8
8.70.2	9	10	11	12
8.90.3	13	14	15	16

[0089] La invención provee además variantes de la cadena pesada y/o liviana de ciertos anticuerpos anti-c-Met humanos arriba enumerados, que comprenden una o más substituciones de aminoácidos. Para designar las variantes, la primera letra es el símbolo de una letra que indica el aminoácido de la cadena del anticuerpo natural, el número se refiere a la posición del aminoácido (donde la posición uno es el aminoácido N-terminal), y la segunda letra es el símbolo de una letra que indica el aminoácido de la variante. En algunas realizaciones, la invención provee la variante de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 13.3.2. Una variante de la cadena pesada de 13.3.2 es E42K, que tiene una lisina en la posición X₂ de SEQ ID NO: 2. La secuencia DNA que codifica la variante E42K 13.3.2 tiene una adenosina en X₁ de SEQ ID NO: 1.

[0090] Una segunda variante de la cadena pesada de 13.3.2 es S97T, que tiene un residuo de treonina en la posición X₄. La secuencia DNA que codifica la variante S97T 13.3.2 tiene una adenosina en X₃ de la SEQ ID NO: 1. Una tercera variante de la cadena pesada de 13.3.2 es A14P, que tiene un residuo de prolina en X₆ de SEQ ID NO: 2. En la secuencia DNA, la variante A14P 13.3.2 es codificada por SEQ ID NO: 1, en la cual X₅ es una citosina. La invención también provee una variante de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 13.3.2. A91T es una variante de la cadena liviana de 13.3.2, representada por SEQ ID NO: 4, donde X₈ es un residuo de treonina. En la secuencia del DNA, la variante A91T 13.3.2 es codificada por SEQ ID NO: 3, en la cual X₇ es adenosina. Los anticuerpos que comprenden una de cadena pesada o liviana variante y una cadena natural se designan mediante la cadena variante. Por lo tanto, un anticuerpo que contiene una cadena liviana natural del anticuerpo 13.3.2 y la cadena pesada E42K variante se designa como 13.3.2H-E42K.

[0091] En otras realizaciones de la invención, pueden producirse anticuerpos que contienen combinaciones de variantes de aminoácidos, por ejemplo, 13.3.2H-E42K,S97T. Se incluyen combinaciones adicionales de una cadena pesada variante y la cadena liviana variante de 13.3.2. En una realización preferida, el anticuerpo anti-c-Met es 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2H-S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T ó 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T. En todavía otras realizaciones, la invención incluye anticuerpos que comprenden secuencias de aminoácidos de dominio variable con una identidad de secuencia mayor de 80%, mayor de 85%, mayor de 90%, mayor de 95%, mayor de 96%, mayor de 97%, mayor de 98% o mayor de 99% con respecto a una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los anticuerpos anti-c-Met humanos arriba mencionados.

Clase y subclase de anticuerpos anti-c-Met

[0092] La clase y subclase de anticuerpos anti-c-Met puede determinarse mediante cualquier método conocido en el arte. En general, la clase y subclase de un anticuerpo puede determinarse usando anticuerpos específicos para una clase y subclase particular del anticuerpo. Tales anticuerpos están comercialmente disponibles. La clase y subclase pueden determinarse mediante ELISA, transferencia de Western, como así también otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase puede determinarse mediante la secuenciación del total o de una porción de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o livianas de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de varias clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

[0093] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-c-Met puede ser una molécula IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. En una realización preferida, el anticuerpo anti-c-Met es una IgG y pertenece a la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó

IgG4. En otra realización preferida, el anticuerpo pertenece a la subclase IgG2.

Afinidad de ligadura de anticuerpos anti-c-Met dirigidos a c-Met

[0094] En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-c-Met se ligan a c-Met con elevada afinidad. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met se liga con c-Met con una K_D de 2×10^{-7} M o menor. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo se liga con c-Met con una K_D de 2×10^{-8} M, 2×10^{-9} M ó 5×10^{-10} M o menor. En una realización aún más preferida, el anticuerpo se liga con c-Met con substancialmente la misma K_D como un anticuerpo seleccionado entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T ó 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T. En aún otra realización preferida, el anticuerpo se liga con c-Met con substancialmente la misma K_D como un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_H de SEQ ID NO: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es glutamato, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es treonina)], 6, 10 ó 14, un dominio variable de cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_L de SEQ ID NO: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16 ó ambos. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga con c-Met con substancialmente la misma K_D como un anticuerpo que comprende las regiones CDR de un dominio variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_L de SEQ ID NO: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16 ó que comprende las regiones CDR de un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_H de SEQ ID NO: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es glutamato, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es treonina)], 6, 10 ó 14.

[0095] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met tiene una baja constante de velocidad de disociación (k_{off}). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met tiene una k_{off} de $1,0 \times 10^{-3} s^{-1}$ o menor o una k_{off} de $5,0 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menor. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo se liga a c-Met con una k_{off} de $2 \times 10^{-4} s^{-1}$ o menor. En algunas realizaciones, la k_{off} es substancialmente la misma como la de un anticuerpo descrito en ésta, incluyendo un anticuerpo seleccionado entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T ó 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T. En algunas realizaciones, el anticuerpo se liga a c-Met con substancialmente la misma k_{off} como un anticuerpo que comprende las regiones CDR de una cadena pesada; o las regiones CDR de una cadena liviana de un anticuerpo seleccionado entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T. En algunas realizaciones, el anticuerpo se liga a c-Met con substancialmente la misma k_{off} como un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_H de SEQ ID NO: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es glutamato, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es treonina)], 6, 10 ó 14, un dominio variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_L de SEQ ID NO: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16 ó ambos. En otra realización preferida, el anticuerpo se liga a c-Met con substancialmente la misma k_{off} como un anticuerpo que comprende las regiones CDR de un dominio variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_L de SEQ ID NO: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina) y la variante 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16; ó las regiones CDR de un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de una región V_H de SEQ ID NO: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es glutamato, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es treonina)], 6, 10 ó 14.

[0096] La afinidad de ligadura y la velocidad de disociación entre un anticuerpo anti-c-Met y c-Met pueden determinarse mediante métodos conocidos en el arte. La afinidad de ligadura puede medirse mediante ELISAs, RIAs, citometría de flujo, resonancia en la superficie de un

sensor recubierto con la muestra (surface plasmon resonance), tal como BIACORE™. La velocidad de disociación puede medirse mediante resonancia en la superficie de un sensor recubierto con la muestra (surface plasmon resonance). Preferentemente, la afinidad de ligadura y la velocidad de disociación se miden mediante resonancia en la superficie de un sensor recubierto con la muestra (surface plasmon resonance). Más preferentemente, la afinidad de ligadura y la velocidad de disociación se miden usando BIACORE™. Puede determinarse si un anticuerpo tiene substancialmente la misma K_D como un anticuerpo anti-c-Met usando métodos conocidos en el arte. El Ejemplo VIII ejemplifica un método para determinar constantes de afinidad de anticuerpos monoclonales anti-c-Met mediante BIACORE™.

Identificación de epítopes de c-Met reconocidos por anticuerpos anti-c-Met

[0097] La invención provee un anticuerpo monoclonal anti-c-Met humano que se liga a c-Met que compite o compite en forma cruzada con y/o liga el mismo epítipo como: (a) un anticuerpo seleccionado entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2H-S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T ó 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T; (b) un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, 6, 10 ó 14, (c) un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 12 ó 16, ó (d) un anticuerpo que comprende ambos, un dominio variable de la cadena liviana como el definido en (b) y un dominio variable de la cadena liviana como el definido en (c).

[0098] Puede determinarse si un anticuerpo se liga al mismo epítipo o compite en forma cruzada para ligarse con un anticuerpo anti-c-Met, usando métodos conocidos en el arte. En una realización, se permite que el anticuerpo anti-c-Met de la invención se ligue a c-Met bajo condiciones de saturación y luego se mide la capacidad del anticuerpo de ensayo para ligarse a c-Met. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de ligarse a c-Met simultáneamente con el anticuerpo anti-c-Met, entonces el anticuerpo de ensayo se liga a un epítipo diferente que el anticuerpo anti-c-Met. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de ligarse a c-Met simultáneamente, entonces el anticuerpo de ensayo se liga al mismo epítipo, a un epítipo solapado o a un epítipo que se encuentra muy cerca del epítipo ligado por el anticuerpo anti-c-Met humano. Este experimento puede realizarse usando ELISA, RIA, BIACORE™, o citometría de flujo. En una realización preferida, el experimento se realiza usando ELISA. Los métodos para determinar K_D se discuten más abajo.

Inhibición de la actividad c-Met mediante un anticuerpo anti-c-Met

[0099] En otra realización, la invención provee un anticuerpo anti-c-Met que inhibe la ligadura de HGF al receptor c-Met. En una realización preferida, el receptor c-Met es humano. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-c-Met es un anticuerpo humano. La IC_{50} puede medirse mediante un ensayo de ligadura de ligandos mediante ELISA, RIA u otros ensayos y mediante ensayos basados en la célula, tales como el ensayo de dispersión "scattering", el cultivo en agar blando y el ensayo de tubulomorfogénesis. En una realización, el anticuerpo o una porción del mismo inhibe la ligadura del ligando entre HGF y c-Met con una IC_{50} no mayor de 5 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente no mayor de 1 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente no mayor de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, aún más preferentemente no mayor de 0,20 $\mu\text{g/ml}$, según lo medido mediante un ensayo ELISA. (Vea Figura 1A). El Ejemplo III ejemplifica este tipo de ensayo.

[0100] En otra realización, la invención provee un anticuerpo anti-c-Met que previene la activación de c-Met en presencia de HGF. En una realización preferida, el anticuerpo anti-c-Met inhibe la fosforilación de tirosina inducida por HGF que se produce con la ligadura a c-Met. Puede determinarse si un anticuerpo anti-c-Met puede prevenir la activación de c-Met en presencia de HGF mediante la determinación de los niveles de autofosforilación de c-Met mediante transferencia de Western o un ensayo ELISA. En una realización preferida, se determinan los niveles de autofosforilación de c-Met usando un ensayo ELISA. En otra realización preferida, la IC_{50} , medida con un ensayo ELISA, no es mayor de 5 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente no mayor de 1 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente no mayor de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, aún más preferentemente no mayor de 0,20 $\mu\text{g/ml}$. El Ejemplo IV ejemplifica un tipo de ensayo que mide la inhibición de la activación de c-Met mediante un anticuerpo anti-c-Met en presencia de HGF (Vea Figura 1B).

[0101] En otro aspecto de la invención, el anticuerpo puede causar una disminución de los niveles de c-Met en la superficie celular después de una incubación con el anticuerpo. En algunas realizaciones, la incubación puede efectuarse durante un periodo de tiempo corto (por ejemplo, 4 horas) o un periodo de tiempo mayor (por ejemplo, 24 horas). Una disminución de los niveles de c-Met en la superficie celular puede medirse mediante transferencia de Western o ELISA. En realizaciones particulares de la invención, el anticuerpo puede causar preferentemente una disminución de 6% de los niveles de c-Met en la superficie celular, preferentemente una disminución de 10%, o más preferentemente una disminución de 20%, más preferentemente una disminución de 50% o aún más preferentemente una disminución de al menos 50% de los niveles de c-Met en la superficie celular medidos mediante transferencia de Western o ELISA. El Ejemplo V ejemplifica un tipo de un ensayo ELISA para medir la disminución de niveles de c-Met en la superficie celular después de una breve incubación con el anticuerpo.

[0102] En otra realización, la invención provee un anticuerpo anti-c-Met que inhibe la formación de colonias en agar blando. En algunas realizaciones, la IC_{50} , medida con un ensayo de cultivo en agar blando, no es mayor de 25 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente no mayor de 20 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente no mayor de 5 $\mu\text{g/ml}$, aún más preferentemente no mayor de 1 $\mu\text{g/ml}$. En otra realización, puede usarse un ensayo de morfogénesis tubular para medir el porcentaje de inhibición de cambios morfológicos dependientes de c-Met en células cultivadas en presencia de HGF y tratadas con anticuerpos de la invención. Preferentemente, el porcentaje de inhibición medido con el ensayo de morfogénesis tubular no es menor de 20%, preferentemente no menor de 60% o aún más preferentemente no menor de 80%. Los Ejemplos VI y VII ejemplifican varios tipos de ensayo.

Inhibición del crecimiento de células tumorosas *in vivo* con anticuerpos anti-c-Met

[0103] De acuerdo con algunas realizaciones, la invención provee un anticuerpo anti-c-Met que inhibe la proliferación de células tumorosas *in vivo*. La célula tumoral puede derivarse de cualquier tipo celular incluyendo, sin limitación, células epidérmicas, epiteliales, endoteliales o mesodérmicas. Las células tumorales pueden derivarse de tumores sólidos o no sólidos incluyendo, pero no estando limitados a, leucemia, sarcoma, mieloma múltiple, glioblastoma, coriocarcinoma, neoplasia de Kaposi o cervical intraepitelial. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met inhibe el crecimiento de tumores de próstata, colon, mamas, ovarianos, gástricos, de pulmón y glioblastomas en un animal. Ejemplos de células inhibidas por anticuerpos anti-c-Met son S114, una línea celular NIH-3T3 construida para expresar HGF humano y c-Met humano (Rong et al., *Mol. Cell. Biol.*, 12(11):5152-5158; (1992); Patente U.S. 4.405.712). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met de la invención se usa para tratar cáncer de pulmón, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y de cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer estomacal, cáncer del colon, cáncer de las mamas, tumores ginecológicos (por ejemplo, sarcomas uterinos, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma cervical, carcinoma de la vagina o carcinoma de la vulva), enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino (por ejemplo, cáncer de la tiroides, paratiroides o de las glándulas adrenales), sarcomas de los tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, tumores sólidos de la niñez, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o de la uretra (por ejemplo, carcinoma de la células renales, carcinoma de la pelvis renal) o neoplasmas del sistema nervioso central (por ejemplo, linfoma del sistema nervioso central (CNS) primario, tumores del eje espinal, gliomas del tronco cerebral o adenomas pituitarios).

[0104] En una realización preferida, el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales en comparación con el crecimiento del tumor en una animal no tratado. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-c-Met inhibe el crecimiento de células tumorales en al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ó 100%. En una realización, la inhibición del crecimiento de células tumorales se mide al menos 7 días después de la iniciación del tratamiento de los animales con el anticuerpo. En otra realización, la inhibición del crecimiento de células tumorales se mide al menos 14 días después de la iniciación del tratamiento de los animales con el anticuerpo. Vea Ejemplo IX. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met causa la regresión de tumores en al menos 10% a 100%.

Activación de c-Met mediante un anticuerpo anti-c-Met

[0105] Otro aspecto de la presente invención implica un anticuerpo anti-c-Met que es un anticuerpo activante, es decir, un agonista de c-Met. Un anticuerpo activante amplifica o substituye los efectos de HGF sobre c-Met. En algunas realizaciones, el anticuerpo activante es esencialmente un mimetizador de HGF y compite con HGF para ligarse a c-Met. En algunas realizaciones, el anticuerpo no compite con HGF para ligarse a c-Met, pero amplifica el efecto de la ligadura de HGF a c-Met. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met activa c-Met en presencia o ausencia de HGF. La actividad agonista del anticuerpo anti-c-Met puede medirse mediante un ensayo ELISA de activación de c-Met. En algunas realizaciones de la invención, la actividad agonista del anticuerpo estimula la actividad de c-Met dos o tres veces en células no estimuladas con HGF. En otras realizaciones, la actividad agonista es de al menos 6 veces. El Ejemplo X describe un ejemplo de un ensayo de activación de c-Met. La actividad agonista del anticuerpo anti-c-Met puede medirse mediante un ensayo de morfogénesis tubular. En una realización de la invención, puede medirse una actividad agonista débil mediante un ensayo de morfogénesis tubular que mide la actividad agonista de c-Met. El Ejemplo X ejemplifica un tipo de ensayo de morfogénesis tubular que mide la actividad agonista de c-Met.

Selectividad para especies y moléculas

[0106] En otro aspecto de la invención, los anticuerpos anti-c-Met muestran ambas, selectividad para especies y selectividad molecular. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met se liga a c-Met humano y de monos cynomologus y rhesus. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met se liga adicionalmente a c-Met de rata. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met no se liga a c-Met de ratón o perro. Siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva, puede determinarse la selectividad para especies del anticuerpo anti-c-Met usando métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad para especies usando transferencia de Western, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación o RIA. En una realización preferida, puede determinarse la selectividad para especies usando citometría de flujo.

[0107] En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met tiene una selectividad para c-Met más de 100 veces mayor que su selectividad para IGF-1R (Receptor del Factor de Crecimiento similar a Insulina 1) (Vea Figura 2). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met no exhibe ninguna ligadura específica apreciable con otra proteína cualquiera distinta a c-Met. Puede determinarse la selectividad del anticuerpo anti-c-Met para c-Met usando métodos bien conocidos en el arte, siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva. Por ejemplo, puede determinarse la selectividad usando transferencia de Western, citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación o RIA.

Métodos para producir anticuerpos y líneas celulares que producen anticuerpos

Inmunización

[0108] En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos se producen mediante la inmunización con un antígeno c-Met de un animal no humano transgénico que comprende dentro de su genoma alguno o todos los loci de cadena pesada y cadena liviana de la inmunoglobulina humana. En una realización preferida, el animal no humano es un animal XENOMOUSE™. (Abgenix, Inc., Fremont, CA).

[0109] Los ratones XENOMOUSE™ son cepas de ratón producidas por ingeniería genética que comprenden grandes fragmentos de loci de cadenas pesadas y cadenas livianas de la inmunoglobulina humana y son deficientes para la producción de anticuerpos de ratón. Vea, por ejemplo, Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994) y Patentes U.S. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 y 6.150.584. Vea también WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 96/33735, WO 98/16654, WO 98/24893, WO 98/50433, WO 99/45031, WO 99/53049, WO 00/09560 y WO 00/037504.

[0110] En otro aspecto, la invención provee un método para fabricar anticuerpos anti-c-Met a partir de animales no ratón, no humanos mediante la inmunización de animales transgénicos no humanos que comprenden loci de inmunoglobulina humana con un antígeno c-Met. Tales animales pueden producirse usando los métodos descritos en los documentos arriba citados. Los métodos revelados en estos documentos pueden ser modificados según lo descrito en la Patente U.S. 5.994.619, la que es incorporada en ésta por referencia. La patente U.S. 5.994.619 describe métodos para producir nuevas células y líneas celulares de masa celular interior (CICM) cultivadas, derivadas de cerdos y vacas, y células CICM transgénicas en las

cuales ha sido insertado DNA heterólogo. Las células CICM transgénicas pueden usarse para producir embriones, fetos y progenie transgénicos clonados. La patente '619 también describe métodos para producir animales transgénicos capaces de transmitir el DNA heterólogo a su progenie. En realizaciones preferidas de la presente invención, los animales no humanos son mamíferos, particularmente ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacunos o caballos.

[0111] Los ratones XENOMOUSE™ producen un repertorio de anticuerpos completamente humanos similares a los de humanos adultos y generan anticuerpos humanos antígeno-específicos. En algunas realizaciones, los ratones XENOMOUSE™ contienen aproximadamente 80% del repertorio de genes V del anticuerpo humano, debido a la introducción en el cromosoma artificial de levadura (YAC) de fragmentos que tienen la configuración de la línea germinal, de tamaño megabase, de los loci de cadena pesada y de los loci de cadena liviana kappa humanos. En otras realizaciones, los ratones XENOMOUSE™ contienen además aproximadamente todo el locus de la cadena liviana lambda humana. Vea Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998), y WO 98/24893, cuya revelaciones están incorporadas en ésta por referencia.

[0112] En algunas realizaciones, los animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulina humana son animales que tienen un "minilocus" de inmunoglobulina humana. En el enfoque de minilocus, se mimetiza un locus de Ig exógena mediante la inclusión de genes individuales del locus de la Ig. De este modo, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, un dominio constante mu y un segundo dominio constante mu (preferentemente un dominio constante gamma) son conformados en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe, *inter alia*, en las Patentes U.S. Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215 y 5.643.763, incorporadas en ésta por referencia.

[0113] En otro aspecto, la invención provee un método para fabricar anticuerpos anti-c-Met humanizados. En algunas realizaciones, animales no humanizados se inmunizan con un antígeno c-Met, según lo descrito más abajo, bajo condiciones que permiten la producción de anticuerpos. Las células que producen anticuerpos se aíslan de los animales, se fusionan con mielomas para producir hibridomas, y se aíslan ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y liviana de un anticuerpo anti-c-Met. Subsecuentemente, estos ácidos nucleicos se producen mediante ingeniería genética usando técnicas conocidas por los entendidos en el arte y descritas más abajo, con el fin de reducir la cantidad de secuencias no humanas, es decir, para humanizar el anticuerpo con el fin de reducir la respuesta inmune en humanos.

[0114] En algunas realizaciones, el antígeno c-Met es c-Met aislado y/o purificado. En una realización preferida, el antígeno c-Met es c-Met humano. En algunas realizaciones, el antígeno c-Met es un fragmento de c-Met. En algunas realizaciones, el fragmento c-Met es el dominio extracelular de c-Met. En algunas realizaciones, el fragmento c-Met comprende al menos un epítipo de c-Met. En otras realizaciones, el antígeno c-Met es una célula que expresa o sobreexpresa c-Met o un fragmento inmunogénico del mismo sobre su superficie. En algunas realizaciones, el antígeno c-Met es una proteína de fusión de c-Met. En algunas realizaciones, c-Met es un péptido sintético inmunógeno.

[0115] La inmunización de animales puede efectuarse mediante cualquier método conocido en el arte. Vea, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Métodos para inmunizar animales no humanos tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado vacuno y caballos son bien conocidos en el arte. Vea, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*, y Patente U.S. 5.994.619. En una realización preferida, el antígeno c-Met se administra con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Adyuvantes típicos incluyen al adyuvante de Freund completo o incompleto, RIBI (didéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimulantes). Tales adyuvantes pueden proteger al polipéptido de una dispersión rápida, secuestrándolo en un depósito local, o pueden contener sustancia que estimulan al hospedante para segregar factores que son quimiotácticos para macrófagos y otros componentes del sistema inmune. Preferentemente, cuando se administra un polipéptido, el plan de inmunización implicará dos o más administraciones del polipéptido repartidas en varias semanas. El Ejemplo I ejemplifica un método para producir anticuerpos monoclonales anti-c-Met en ratones XenoMouse™.

Producción de anticuerpos y líneas celulares que producen anticuerpos

[0116] Después de la inmunización de un animal con un antígeno c-Met, pueden obtenerse del animal anticuerpos y/o células que producen anticuerpos. En algunas realizaciones, se obtiene del animal un suero que contiene el anticuerpo anti-c-Met desangrando o sacrificando al animal. El suero puede usarse tal como se obtiene del animal, puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina del mismo o pueden purificarse anticuerpos anti-c-Met del suero.

[0117] En algunas realizaciones, se preparan líneas celulares inmortalizadas que producen anticuerpos a partir de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal es sacrificado y el nodo linfático y/o las células B del bazo son inmortalizadas mediante cualquier medio conocido en el arte. Métodos para inmortalizar células incluyen, pero no están limitados a, transfectar las células con oncogenes, infectarlas con un virus oncogénico y cultivarlas bajo condiciones selectivas para células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionarlas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma e inactivar un gen supresor de tumores. Veá, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*. Cuando se usa fusión con células de mieloma, las células de mieloma preferentemente no segregan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretoria). Las células inmortalizadas se rastrean usando c-Met, una porción del mismo o una célula que expresa c-Met. En una realización preferida, la selección inicial se realiza usando un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de rastreo con ELISA se provee en WO 00/37504, incorporado en ésta por referencia.

[0118] Las células que producen anticuerpos anti-c-Met, por ejemplo, hibridomas, son seleccionadas, clonadas y rastreadas adicionalmente para obtener características deseables, incluyendo crecimiento robusto, elevada producción de anticuerpos y características deseables del anticuerpo, según lo discutido más abajo. Los hibridomas pueden expandirse *in vivo* en animales singénicos, en animales que carecen de un sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en un cultivo celular *in vitro*. Métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los entendidos en el arte.

[0119] En una realización preferida, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa genes de inmunoglobulina humana, y las células B del bazo se fusionan con una línea celular de mieloma de la misma especie del animal no humano. En una realización más preferida, el animal inmunizado es un ratón XENOMOUSE™ y la línea celular del mieloma es un mieloma de ratón no secretorio. En una realización aún más preferida, la línea celular del mieloma es P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection). Veá, por ejemplo, Ejemplo I.

[0120] Por lo tanto, en una realización, la invención provee métodos para producir una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento del mismo dirigido a c-Met, métodos que comprenden (a) inmunizar un animal transgénico no humano descrito en ésta con c-Met, una porción de c-Met o una célula o tejido que expresa c-Met; (b) esperar que el animal transgénico tenga una respuesta inmune a c-Met; (c) aislar células que producen anticuerpos del animal transgénico; (d) inmortalizar las células que producen el anticuerpo; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células inmortalizadas que producen el anticuerpo; y (f) rastrear las células inmortalizadas que producen el anticuerpo para identificar un anticuerpo dirigido a c-Met.

[0121] En otro aspecto, la invención provee hibridomas que producen un anticuerpo anti-c-Met humano. En una realización preferida, los hibridomas son hibridomas de ratón, según lo descrito anteriormente. En otras realizaciones, los hibridomas se producen en una especie no humana, no ratón, tales como ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacunos o caballos. En otra realización, los hibridomas son hibridomas humanos.

[0122] En una realización de la invención, células que producen el anticuerpo se aíslan y se expresan en células hospedantes, por ejemplo células de mieloma. En otra realización preferida, se inmuniza un animal transgénico con c-Met, se aíslan células primarias, por ejemplo, células del bazo o de sangre periférica del animal transgénico inmunizado y se identifican células individuales que producen anticuerpos específicos para el antígeno deseado. De cada célula individual se aísla mRNA poliadenilado y se realiza reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con transcripción inversa, usando cebadores sentido que hibridan con secuencias de la región variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayoría o todas las regiones FR1 de genes del dominio variable de cadena pesada y liviana humana, y cebadores antisentido que hibridan con secuencias de la región constante o de unión. Luego, cDNAs de los dominios variables de cadena pesada y liviana se

clonan y se expresan en cualquier célula hospedante adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de la inmunoglobulina respectiva, tales como la cadena pesada y los dominios constantes κ ó λ . Veá Babcook, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996, incorporados en ésta por referencia.

Luego, los anticuerpos anti-c-Met pueden identificarse y aislarse según lo descrito en ésta.

[0123] En otra realización, pueden usarse técnicas de exhibición en fagos para proveer bibliotecas que contienen un repertorio de anticuerpos con afinidades variadas para c-Met. Para la producción de tales repertorios, no es necesario inmortalizar las células B del animal inmunizado. Más bien, las células B primarias pueden usarse directamente como fuente de DNA. La mezcla de cDNAs obtenida a partir de células B, por ejemplo, derivada de bazo, se usa para preparar una biblioteca de expresión, por ejemplo, una biblioteca de exhibición en fagos transfectada en *E. coli*. Las células resultantes se ensayan por inmunoreactividad a c-Met. Las técnicas para la identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad a partir de tales bibliotecas se describen en Griffiths et al., *EMBO J.*, 13:3245-3260 (1994); Nissim et al., *ibid*, pp. 692-698 y en Griffiths et al., *ibid*, 12:725-734, que son incorporadas en ésta por referencia. Finalmente, se identifican clones de la biblioteca que producen afinidades de ligadura de una magnitud deseada para el antígeno y se recupera el DNA que codifica el producto responsable para tal ligadura, DNA que se manipula para expresión recombinante estándar. También pueden construirse bibliotecas de exhibición en fagos usando secuencias nucleotídicas previamente manipuladas y rastreadas de un modo similar. Generalmente, los cDNAs que codifican cadenas pesadas y livianas se proveen en forma independiente o ligados para formar análogos del gen Fv para la producción en la biblioteca de fagos.

[0124] Luego, la biblioteca de fagos se rastrea por los anticuerpos con las afinidades mayores para c-Met y se recupera el material genético del clon apropiado. Ciclos adicionales de rastreo pueden aumentar la afinidad del anticuerpo original aislado.

Ácidos nucleicos, vectores, células hospedantes y métodos recombinantes para fabricar anticuerpos

Ácidos nucleicos

[0125] La presente invención también comprende moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-c-Met. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican una cadena pesada y una cadena liviana de una inmunoglobulina anti-c-Met. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada y una cadena liviana de una inmunoglobulina anti-c-Met. En una realización, el ácido nucleico codifica un anticuerpo anti-c-Met de la invención.

[0126] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena liviana (V_L) comprende un gen L5Vk1 ó A27Vk3 humano, y un gen Jk1, Jk2, Jk3, ó Jk4.

[0127] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 substituciones de la secuencia (las secuencias) de aminoácidos de la línea germinal. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos V_L que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 substituciones con aminoácidos conservativos y/o 1, 2 ó 3 substituciones no conservativas en comparación con las secuencias V_L y J_K de la línea germinal. Las substituciones pueden encontrarse en las regiones CDR, las regiones framework o en el dominio constante.

[0128] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_L que comprende una o más variantes en comparación con la secuencia germinal que son idénticas a las variaciones encontradas en el V_L de uno de los anticuerpos 13.3.2, 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T.

[0129] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica al menos tres substituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal encontrada en el V_L de uno de los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T.

[0130] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos V_L del anticuerpo monoclonal 13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina); 9.1.2 (SEQ ID NO: 8); 8.70.2 (SEQ ID NO: 12); ó 8.90.3 (SEQ ID NO: 16), o una variante o porción de la misma. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende las CDRs de cadena liviana de uno de dichos anticuerpos arriba

enumerados. En algunas realizaciones, dicha porción es una porción contigua que comprende CDR1-CDR3.

[0131] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOs: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16 o dicha secuencia que carece de la secuencia señal. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 3 [13.3.2 (SEQ ID NO: 3, donde X_7 es guanosina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 3, donde X_7 es adenosina)], 7, 11 ó 15, o una porción de la misma, careciendo dichas secuencias opcionalmente de la secuencia señal.

[0132] En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos de las CDRs de la cadena liviana de dicho anticuerpo. En algunas realizaciones, dicha porción codifica una región contigua de las CDR1-CDR3 de la cadena liviana de un anticuerpo anti-c-Met.

[0133] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_L que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ó 99% idéntica a una de las secuencias de aminoácidos V_L mostradas en las Fig. 3A-3D o a una secuencia de aminoácidos V_L de una región V_L cualesquiera de los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T o una secuencia de aminoácidos de una región V_L de una secuencia cualquiera entre SEQ ID NOs: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones altamente severas, tales como aquellas descritas precedentemente, con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de una molécula de ácidos nucleicos que codifica una región V_L de SEQ ID NOs: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16 o que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de una molécula de ácido nucleico que codifica una región V_L de SEQ ID NOs: 3 [13.3.2 (SEQ ID NO: 3, donde X_7 es guanosina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 3, donde X_7 es adenosina)], 7, 11 ó 15.

[0134] En otra realización, el ácido nucleico codifica una cadena liviana de longitud completa de un anticuerpo seleccionado entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 ó 13.3.2L-A91T, o una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 8, 12 ó 16, o una cadena liviana que comprende una mutación, tal como una revelada en ésta. Además, el ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de las SEQ ID NOs: 3 [13.3.2 (SEQ ID NO: 3, donde X_7 es guanosina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 3, donde X_7 es adenosina)], 7, 11 ó 15, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena liviana que comprende una mutación, tal como una revelada en ésta.

[0135] En otra realización preferida, la molécula de ácido nucleico codifica el dominio variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia del gen V_H humano 1-18, 4-31, 4-39 ó 3-48 o una secuencia derivada del mismo. En varias realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende un gen V_H 1-18 humano, un gen D2-15 y un gen J_H4b humano; un gen V_H 4-31 humano, genes D2-2 y D7-27 humanos y un gen J_H6b ; un gen V_H 4-31 humano, un gen D2-2 humano y un gen J_H6b humano; un gen V_H 4-31 humano, un gen D7-27 humano y un gen J_H6b humano; un gen V_H 4-39 humano, un gen D2-2 humano y un gen J_H4b humano; un gen V_H 3-48 humano, un gen D4-17 humano y un gen J_H4b humano, o una secuencia derivada de los genes humanos.

[0136] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 mutaciones en comparación con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal de los genes V, D o J humanos. En algunas realizaciones, dichas mutaciones se encuentran en la región V_H . En algunas realizaciones, dichas mutaciones se encuentran en las regiones CDR.

[0137] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una o más mutaciones de aminoácidos, en comparación con la secuencia de la línea germinal, que son idénticas a mutaciones de aminoácidos encontradas en el V_H del anticuerpo monoclonal 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T ó 13.3.2H-A14P,E42K,S97T. En algunas realizaciones, el ácido nucleico codifica al menos tres mutaciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de la línea

germinal que son idénticas a al menos tres mutaciones de aminoácidos encontradas en uno de los anticuerpos monoclonales arriba enumerados.

[0138] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica al menos una porción de la secuencia de aminoácidos V_H de un anticuerpo monoclonal seleccionado entre 13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato y X₄ es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina y X₄ es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina y X₄ es treonina); 9.1.2 (SEQ ID NO: 6); 8.70.2 (SEQ ID NO: 10); ó 8.90.3 (SEQ ID NO: 14), una variante de la misma, o dicha secuencia tiene mutaciones con aminoácidos conservativos y/o un total de tres o menos substituciones con aminoácidos no conservativos. En varias realizaciones, la secuencia codifica una o más regiones CDR, preferentemente una región CDR3, todas las tres regiones CDR, una porción contigua incluyendo CDR1-CDR3 o la región V_H entera, con o sin una secuencia señal.

[0139] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NOs: 2, 6, 10 ó 14, o dicha secuencia carece de la secuencia señal. En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico comprende al menos una porción de la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1 [13.3.2 (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es guanosina, X₃ es treonina y X₅ es guanosina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es treonina y X₅ es guanosina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es adenosina y X₅ es guanosina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es guanosina, X₃ es treonina y X₅ es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es treonina y X₅ es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es adenosina y X₅ es citosina)], 5, 9 ó 13, o dicha secuencia carece de la secuencia señal. En algunas realizaciones, dicha porción codifica la región V_H (con o sin una secuencia señal), una región CDR3, todas las tres regiones CDR o una región contigua incluyendo CDR1-CDR3.

[0140] En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos V_H que es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ó 99% idéntica a las secuencias de aminoácidos V_H mostradas en las Figs. 3E-3H o a la secuencia de aminoácidos V_H de una secuencia cualquiera entre SEQ ID NOs: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato y X₄ es serina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina y X₄ es serina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina y X₄ es treonina)], 6, 10 ó 14. Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ácidos nucleicos que hibridan bajo condiciones altamente severas, tales como aquellas descritas precedentemente, con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina y X₆ es alanina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina y X₆ es alanina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina y X₆ es alanina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina y X₆ es prolina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina y X₆ es prolina); 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina y X₆ es prolina)], 6, 10 ó 14, o con una región V_H de la misma, o que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NOs: 1 [13.3.2 (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es guanosina, X₃ es treonina y X₅ es guanosina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es treonina y X₅ es guanosina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es adenosina y X₅ es guanosina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es guanosina, X₃ es treonina y X₅ es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es treonina y X₅ es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X₁ es adenosina, X₃ es adenosina y X₅ es citosina)], 5, 9 ó 13, o que codifica una región V_H de la misma.

[0141] En otra realización, el ácido nucleico codifica una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo seleccionado entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P, E42K; 13.3.2H-E42K, S97T ó 13.3.2H-A14P, E42K, S97T, o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina y X₆ es alanina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina y X₆ es alanina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina y X₆ es alanina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es glutamato, X₄ es serina y X₆ es prolina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es serina y X₆ es prolina); 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X₂ es lisina, X₄ es treonina y X₆ es prolina)], 6, 10 ó 14, con o sin una secuencia señal o una cadena

pesada que comprende una mutación tal como una de las variantes discutidas en ésta. Además, el ácido nucleico puede comprender la secuencia nucleotídica de SEQ ID NOs: 1 [13.3.2 (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es guanosina, X_3 es treonina y X_5 es guanosina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenosina, X_3 es treonina y X_5 es guanosina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenosina, X_3 es adenosina y X_5 es guanosina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es guanosina, X_3 es treonina y X_5 es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenosina, X_3 es treonina y X_5 es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenosina, X_3 es adenosina y X_2 es citosina)], 5, 9 ó 13, con o sin una secuencia señal, o una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende una mutación, tal como una de las variantes discutidas en ésta.

[0142] Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o liviana de una anticuerpo anti-c-Met o porciones del mismo puede aislarse de cualquier fuente que produce tal anticuerpo. En varias realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de una célula B aislada de un animal inmunizado con c-Met o de una célula inmortalizada derivada de una célula B tal que expresa un anticuerpo anti-c-Met. Métodos para aislar mRNA que codifica un anticuerpo son bien conocidos por el arte. Vea, por ejemplo, Sambrook et al. El mRNA puede usarse para producir cDNA a ser utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o en la clonación con cDNA de genes del anticuerpo. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico se aísla de un hibridoma que tiene como uno de sus compañeros de fusión una célula de un animal transgénico no humano que produce una inmunoglobulina humana. En una realización aún más preferida, la célula que produce inmunoglobulina humana se aísla de un animal XENOMOUSE™. En otra realización, la célula que produce inmunoglobulina humana es de un animal transgénico no humano, no ratón, según lo descrito precedentemente. En otra realización, el ácido nucleico se aísla de una animal no transgénico, no humano. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de una animal no humano, no transgénico pueden usarse, por ejemplo, para anticuerpos humanizados.

[0143] En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-c-Met de la invención puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un dominio V_H de la invención unido en el marco de lectura con una secuencia nucleotídica que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. Similarmente, una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena liviana de un anticuerpo anti-c-Met de la invención puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un dominio V_L de la invención unida en el marco de lectura con una secuencia nucleotídica que codifica un dominio constante de cadena liviana de cualquier fuente.

[0144] En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesadas (V_H) y/o livianas (V_L) se "convierten" en genes del anticuerpo de longitud completa. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes del anticuerpo de longitud completa mediante la inserción en un vector de expresión que ya codifica dominios constantes de cadena pesada (C_H) o dominios constantes de cadena liviana (C_L), respectivamente, de modo que el segmento V_H se liga operativamente al segmento (a los segmentos) C_H dentro del vector, y/o el segmento V_L se liga operativamente al segmento C_L dentro del vector. En otra realización, moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H y/o V_L se convierten en genes del anticuerpo de longitud completa, enlazando, por ejemplo, ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica dominios V_H y/o V_L con una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio C_H y/o C_L , usando técnicas estándar de biología molecular. El arte conoce secuencias de ácidos nucleicos de genes del dominio constante de cadenas pesadas o livianas de la inmunoglobulina humana. Vea, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991. Luego, moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o livianas de longitud completa pueden ser expresadas por una célula en la cual han sido introducidas y el anticuerpo anti-c-Met puede ser aislado.

[0145] Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar recombinantemente grandes cantidades de anticuerpos anti-c-Met. Las moléculas de ácido nucleico también pueden usarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena simple, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, según lo descrito más abajo. Si las moléculas de ácido nucleico se derivan de

una animal no humano, no transgénico, las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la humanización de anticuerpos, también según lo descrito más abajo.

[0146] En otra realización, se usa una molécula de ácido nucleico de la invención como sonda o cebador PCR para una secuencia específica del anticuerpo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede usarse como sonda en métodos diagnósticos o como cebador PCR para amplificar regiones de DNA que pueden ser usadas, inter alia, para aislar moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican dominios variables de anticuerpos anti-c-Met. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pertenecen a dominios altamente variables de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo de interés. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos codifican el total o una parte de una o más de las CDRs de los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3 o variantes de los mismos, según lo descrito en ésta.

Vectores

[0147] La invención provee vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-c-Met de la invención o una porción que liga antígeno del mismo. La invención también provee vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena liviana de tales anticuerpos o porción que liga antígeno del mismo. La invención provee además vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos y sondas de los mismos.

[0148] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-c-Met o las porciones que ligan antígeno de la invención se expresan insertando DNAs que codifican cadenas livianas y pesadas de longitud parcial o completa, obtenidos según lo descrito precedentemente, en vectores de expresión, de modo que los genes son ligados operativamente con secuencias de control de expresión necesarias tales como secuencias de control de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas tales como virus del mosaico de coliflor, virus del mosaico de tabaco, cósmidos, YACs, episomas derivados de EBV y similares. El gen del anticuerpo es ligado dentro de un vector de modo que secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector pueden ejercer su función de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen de modo que sean compatibles con la célula hospedante usada para la expresión. El gen de la cadena liviana del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados. En una realización preferida, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y vector, o ligadura con formación de extremos romos si no existen sitios de restricción).

[0149] Un vector conveniente es un vector que codifica una secuencia C_H o C_L funcionalmente completa de la inmunoglobulina humana, con sitios de restricción apropiados construidos por métodos de ingeniería genética de modo que cualquier secuencia V_H o V_L puede ser insertada y expresada fácilmente, según lo descrito precedentemente. En tales vectores, el corte y empalme se produce usualmente entre el sitio dador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede el dominio C humano, y también se produce en las regiones de corte y empalme que existen dentro de los exones del C_H humano. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosomales nativos corriente abajo de la regiones de codificación. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula hospedante. El gen de la cadena del anticuerpo puede ser clonado en el vector de modo que el péptido señal sea ligado en el marco de lectura con el terminal amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no sea una inmunoglobulina).

[0150] Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedante. Será apreciado por los entendidos en el arte que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias regulatorias, puede depender de factores tales como la elección de la célula

hospedante a ser transformada, el nivel de expresión deseado de la proteína, etc. Secuencias regulatorias preferidas para la expresión en células hospedantes mamíferas incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células mamíferas, tales como promotores y/o intensificadores derivados de secuencias largas terminales repetidas (LTRs) de retrovirus, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/intensificador de CMV), Virus Simian 40 (SV40) (tal como el promotor/intensificador de S40, adenovirus, (por ejemplo, el promotor principal tardío de adenovirus (adenovirus major late promoter = AdMLP)), poliovirus y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores de inmunoglobulina natural y actina. Para una descripción adicional de elementos regulatorios virales y secuencias de los mismos vea, por ejemplo, las Patentes U.S. Nos. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615. Los métodos para expresar anticuerpos en plantas, incluyendo una descripción de promotores y vectores, como así también los métodos para la transformación de plantas son conocidos por el arte. Vea, por ejemplo, la Patente U.S. 6.517.529, incorporada en ésta por referencia. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos por el arte.

[0151] Además de los genes de las cadenas del anticuerpo y de secuencias regulatorias, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedantes (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de las células hospedantes en las cuales se introdujo el vector (vea, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, incorporadas en ésta por referencia). Por ejemplo, típicamente el gen marcador de selección confiere resistencia a drogas, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedante en la cual se introdujo el vector. Genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (a ser usado en células hospedantes dhfr con selección/amplificación de metotrexato) el gen neo (para la selección de G418) y el gen glutamato sintetasa.

Células hospedantes no hibridoma y métodos recombinantes para producir proteínas

[0152] Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-c-Met y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la transfección de una célula hospedante mamífera, vegetal, bacteriana o de levadura adecuada. La transformación puede realizarse mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedante. Métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células mamíferas son bien conocidos por el arte e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación del (de los) polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del DNA en núcleos. Además, moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células mamíferas mediante vectores virales. Métodos para la transformación de células son bien conocidos por el arte. Vea, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455, incorporadas en ésta por referencia). Métodos de transformación de células vegetales son bien conocidos por el arte, incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por agrobacterium, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Métodos para transformar células bacterianas y de levadura también son bien conocidos por el arte.

[0153] Líneas celulares mamíferas disponibles como hospedantes para la expresión son bien conocidas por el arte e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la colección American Type Culture Collection (ATCC). Estas líneas celulares incluyen, *inter alia*, células del ovario del hamster chino (Chinese hamster ovary (CHO) cells), células NSO, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de la cría de hamster (baby hamster kidney (BHK) cells), células del riñón del mono verde africano (COS), células del carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y un número de otras líneas celulares. Líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando aquellas líneas celulares que tienen elevados niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insectos, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes del anticuerpo en células hospedantes mamíferas, los anticuerpos son producidos cultivando las células hospedantes durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedantes o, más preferentemente, mediante la secreción del

anticuerpo en el medio del cultivo en el cual se cultivan las células hospedantes. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar para la purificación de proteínas. Células vegetales hospedantes incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua (duckweed), maíz, trigo, papa, etc. Células hospedantes bacterianas incluyen las especies *E. coli* y *Streptomyces*. Células hospedantes de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

[0154] Además, la expresión de anticuerpos de la invención de líneas celulares de producción puede intensificarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión de genes con glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para aumentar la expresión bajo ciertas condiciones. El sistema GS se discute total o parcialmente en conexión con las Patentes Europeas Nos. 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

[0155] Es probable que anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tendrán una glicosilación diferente entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico provistas en ésta, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en ésta, forman parte de la presente invención, independientemente de la glicosilación de los anticuerpos.

Animales y plantas transgénicos

[0156] Los anticuerpos anti-c-Met de la invención también pueden producirse transgénicamente mediante la generación de un mamífero o planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y liviana de la inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable del mismo. En conexión con la producción transgénica en mamíferos, anticuerpos anti-c-Met pueden producirse en, y recuperarse de, la leche de cabras, vacas y otros mamíferos. Vea, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957, incorporadas en ésta por referencia. En algunas realizaciones, animales no humanos transgénicos que comprenden loci de inmunoglobulina humana son inmunizados con c-Met o una porción inmunogénica del mismo, según lo descrito precedentemente. Métodos para producir anticuerpos en plantas están descritos, por ejemplo, en las patentes U.S. 6.046.037 y 5.959.177, incorporadas en ésta por referencia.

[0157] En algunas realizaciones, animales no humanos transgénicos o plantas son producidos mediante la introducción de uno o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-c-Met de la invención en el animal o planta usando plantas transgénicas estándar. Vea Hogan y la Patente de Estados Unidos 6.417.429, *supra*. Las células transgénicas usadas para hacer el animal transgénico pueden ser células del tronco embrionario o células somáticas o un huevo fertilizado. Los organismos transgénicos no humanos pueden ser quiméricos, heterocigotas no quiméricos y homocigotas no quiméricos. Vea, por ejemplo, Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); y Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999), todos incorporados en ésta por referencia. En algunas realizaciones, los animales transgénicos no humanos tienen una ruptura brusca y reemplazo dirigidos mediante una construcción objetivo que codifica una cadena pesada y/o una cadena liviana de interés. En una realización preferida, los animales transgénicos comprenden y expresan moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y livianas que se ligan específicamente a c-Met, preferentemente c-Met humano. En algunas realizaciones, los animales transgénicos comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo modificado tal como un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos anti-c-Met pueden fabricarse en cualquier animal transgénico. En una realización preferida, los animales no humanos son ratones, ratas, ovejas, cerdos, cabras, ganado vacuno o caballos. Los animales transgénicos no humanos expresan dichos polipéptidos codificados en sangre, leche, orina, saliva, lágrimas, moco y otros fluidos corporales.

Bibliotecas de exhibición en fagos

[0158] La invención provee un método para producir un anticuerpo anti-c-Met o una porción que liga antígeno del mismo que comprende las etapas de sintetizar una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, rastrear la biblioteca con c-Met o una porción del mismo, aislar el fago que liga c-Met y obtener el anticuerpo del fago. A modo de ejemplo, un método para preparar la biblioteca de anticuerpos para ser usada en técnicas de exhibición en fagos comprende las etapas de inmunizar un animal no humano que contiene loci de

inmunoglobulina humana con c-Met o una porción antigénica del mismo para crear una respuesta inmune, extraer células que producen anticuerpos del animal inmunizado; aislar de las células extraídas RNA que codifica cadenas pesadas y livianas de anticuerpos de la invención, efectuar transcripción inversa con el RNA para producir cDNA, amplificar el cDNA usando cebadores e insertar el cDNA en un vector de exhibición en fagos, de modo que los anticuerpos sean expresados en el fago. De este modo pueden obtenerse anticuerpos anti-c-Met recombinantes de la invención.

[0159] Los anticuerpos recombinantes anti-c-Met de la invención pueden aislarse rastreando una biblioteca combinatoria de anticuerpos recombinantes. Preferentemente, la biblioteca es una biblioteca que exhibe en fagos scFv generada usando cDNAs de V_L y V_H humanos preparados a partir de mRNA aislado de células B. Los métodos para preparar y rastrear tales bibliotecas son conocidos por el arte. Equipos para generar bibliotecas que exhiben en fagos están comercialmente disponibles (por ejemplo, el sistema de anticuerpos recombinantes en fagos Pharmacia (Pharmacia Recombinant Phage Antibody System), número de catálogo 27-9400-01; y el equipo de exhibición en fagos Stratagene SurfZAP™, número de catálogo 240612). También existen otros métodos y reactivos que pueden usarse para generar y rastrear bibliotecas que exhiben anticuerpos (vea, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.223.409; Publicación PCT Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc. Acids Res.* 19:4133-4137 (1991); y Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991), todos incorporados en ésta por referencia.

[0160] En una realización, para aislar y producir anticuerpos anti-c-Met humanos con las características deseadas, primero se usa un anticuerpo anti-c-Met humano como descrito en ésta para seleccionar secuencias de cadenas pesadas y livianas humanas que tengan una actividad de ligadura similar hacia c-Met, usando métodos de imprinting de epitopes descritos en la publicación PCT No. WO 93/06213, incorporada en ésta por referencia. Las bibliotecas de anticuerpos usadas en este método son preferentemente bibliotecas en scFv preparadas y rastreadas según lo descrito en la publicación PCT No. WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993), todas incorporadas en ésta por referencia. Las bibliotecas de anticuerpos en scFv son rastreadas preferentemente usando como antígeno c-Met humano.

[0161] Una vez seleccionados dominios V_L y V_H iniciales humanos, se realizan experimentos de "mix and match" ("mezclar y unir"), en los cuales se rastrean diferentes pares de los segmentos V_L y V_H inicialmente seleccionados para la ligadura con c-Met, para seleccionar combinaciones preferidas de pares V_L/V_H . Adicionalmente, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H del (de los) par(es) preferido(s) V_L/V_H pueden ser sometidos a mutación aleatoria, preferentemente dentro de la región CDR3 del V_H y/o V_L , en un proceso análogo al proceso de mutación somática in vivo responsable por la maduración de la afinidad de anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración de la afinidad in vitro puede lograrse mediante la amplificación de dominios V_H y V_L , usando cebadores PCR complementarios a la CDR3 del V_H o CDR3 del V_L , respectivamente, cebadores que han sido "spiked" con (a los cuales se ha agregado) una mezcla aleatoria de las cuatro bases nucleotídicas en ciertas posiciones, de modo que los productos PCR resultantes codifiquen segmentos V_H y V_L en los cuales han sido introducidas mutaciones aleatorias en las regiones CDR3 del V_H y/o CDR3 del V_L . Estos segmentos V_H y V_L sometidos a mutación aleatoria pueden rastrearse nuevamente para la ligadura con c-Met.

[0162] Después de la selección y aislación de un anticuerpo anti-c-Met de la invención a partir de una biblioteca que exhibe inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado pueden recuperarse del paquete de exhibición (display package) (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas de DNA recombinante estándar. Si deseado, el ácido nucleico puede ser sometido a manipulación adicional para crear otras formas del anticuerpo de la invención, según lo descrito más abajo. Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado

mediante el rastreo de una biblioteca combinatoria, el DNA que codifica el anticuerpo es clonado en un vector de expresión recombinante e introducido en células hospedantes mamíferas según lo descrito precedentemente.

Conmutación de clases

[0163] Otro aspecto de la invención provee un método para convertir la clase o subclase de un anticuerpo anti-c-Met en otra clase o subclase. En algunas realizaciones, se aísla una molécula de ácido nucleico que codifica un V_L o V_H que no incluye secuencias que codifican C_L o C_H usando métodos bien conocidos por el arte. Luego, la molécula de ácido nucleico se liga operativamente con una secuencia de ácido nucleico que codifica un C_L o C_H de una clase o subclase deseada de inmunoglobulina. Esto puede lograrse usando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , según lo descrito precedentemente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-c-Met que originalmente fue una IgM puede ser cambiado de clase a una IgG. Además, la conmutación de clase puede usarse para convertir una subclase IgG a otra subclase, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Otro método para producir un anticuerpo de la invención que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-c-Met y un ácido nucleico que codifica una cadena liviana de un anticuerpo anti-c-Met, aislar la secuencia que codifica la región V_H , ligar la secuencia V_H con una secuencia que codifica un dominio constante de la cadena pesada del isotipo deseado, expresar el gen de la cadena liviana y la construcción de la cadena pesada en una célula, y recolectar el anticuerpo anti-c-Met con el isotipo deseado.

Anticuerpos desinmunizados

[0164] En otro aspecto de la invención, el anticuerpo puede desinmunizarse para reducir su inmunogenicidad usando las técnicas descritas en, por ejemplo, las Publicaciones PCT Nos. WO98/52976 y WO00/34317 (incorporadas en ésta por referencia).

Anticuerpos mutados

[0165] En otra realización, las moléculas de ácido nucleico, los vectores y las células hospedantes pueden usarse para fabricar anticuerpos anti-c-Met mutados. Los anticuerpos pueden ser mutados en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o livianas, por ejemplo, para modificar una propiedad de ligadura del anticuerpo. Por ejemplo, puede efectuarse una mutación en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo para c-Met, para aumentar o disminuir k_{off} o para modificar la especificidad de ligadura del anticuerpo. Técnicas de mutagénesis dirigidas a un sitio son bien conocidas por el arte. Vea, por ejemplo, Sambrook et al. y Ausubel et al., supra. En otra realización, pueden efectuarse una o más mutaciones en un residuo de aminoácido del cual se sabe que ha sido modificado, con respecto a la línea germinal, de un anticuerpo monoclonal 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T ó 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T. Las mutaciones pueden efectuarse en una región CDR o una región framework de un dominio variable, o en un dominio constante. En una realización preferida, las mutaciones se efectúan en un dominio variable. En algunas realizaciones, se efectúan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido del cual se sabe que está modificado con respecto a la línea germinal en una región CDR o región framework de un dominio variable de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 2 [13.3.2 (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es glutamato, X_4 es serina y X_6 es alanina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es serina y X_6 es alanina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es treonina y X_6 es alanina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es glutamato, X_4 es serina y X_6 es prolina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es serina y X_6 es prolina); 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 2, donde X_2 es lisina, X_4 es treonina y X_6 es prolina)], 4 [13.3.2 (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es alanina) y la 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 4, donde X_8 es treonina)], 6, 8, 10, 12, 14 ó 16 o cuya secuencia de ácidos nucleicos está presente en SEQ ID NOs: 1 [13.3.2 (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es guanósina, X_3 es treonina y X_5 es guanósina); 13.3.2H-E42K (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenósina, X_3 es treonina y X_5 es guanósina); 13.3.2H-E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenósina, X_3 es adenósina y X_5 es guanósina); 13.3.2H-A14P (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es guanósina, X_3 es treonina y X_5 es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenósina, X_3 es treonina y X_5 es citosina); 13.3.2H-A14P, E42K, S97T (SEQ ID NO: 1, donde X_1 es adenósina, X_3 es adenósina y X_5 es citosina)], 3 [13.3.2 (SEQ ID NO: 3, donde X_7 es

guanosina); 13.3.2L-A91T (SEQ ID NO: 3, donde X₇ es adenosina)], 5, 7, 9, 11, 13 ó 15.

[0166] En otra realización, se efectúa una mutación en la región framework, de modo que la región (las regiones) framework resultante(s) tiene(n) la secuencia de aminoácidos del gen correspondiente de la línea germinal. Puede efectuarse una mutación en una región framework o un dominio constante para aumentar la vida media del anticuerpo anti-c-Met. Vea, por ejemplo, Publicación PCT No. WO 00/09560, incorporada en ésta por referencia. También puede efectuarse una mutación en una región framework o en un dominio constante para modificar la inmunogenecidad del anticuerpo, para proveer un sitio para la ligadura covalente o no covalente con otra molécula, o para modificar propiedades tales como fijación de complemento, ligadura con FcR y citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)). De acuerdo con la invención, un anticuerpo simple puede tener mutaciones en cualquier o en varias regiones CDRs o framework del dominio variable o en el dominio constante.

[0167] En algunas realizaciones, hay de 1 a 8, incluyendo cualquier número intermedio, mutaciones de aminoácidos en cualquiera de los dominios V_H o V_L del anticuerpo anti-c-Met mutado en comparación con el anticuerpo anti-c-Met previo a la mutación. En cualquier caso de los arriba mencionados, las mutaciones pueden ocurrir en una o más regiones CDR. Además, cualquiera de las mutaciones puede consistir de sustituciones con aminoácidos conservativos. En algunas realizaciones, no hay más de 5, 4, 3, 2 ó 1 cambios de aminoácido en los dominios constantes.

Anticuerpos modificados

[0168] En otra realización, puede fabricarse un anticuerpo de fusión o una inmunoadhesina que comprende el total o una porción de un anticuerpo anti-c-Met de la invención ligado con otro polipéptido. En una realización preferida, solo los dominios variables del anticuerpo anti-c-Met están ligados con el polipéptido. En otra realización preferida, el dominio V_H de un anticuerpo anti-c-Met está ligado con un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo anti-c-Met está ligado con un segundo polipéptido, asociado con el primer polipéptido de modo tal que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí para formar un sitio de ligadura de antígeno. En otra realización preferida, el dominio V_H está separado del dominio V_L mediante un engarce, de modo que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí (vea abajo bajo anticuerpos de una sola cadena). Luego, el anticuerpo V_H-engarce-V_L es ligado con el polipéptido de interés. El anticuerpo de fusión es útil para dirigir un polipéptido hacia una célula o tejido que expresa c-Met. El polipéptido puede ser un agente terapéutico, tal como una toxina, un factor de crecimiento u otra proteína regulatoria, o puede ser un agente diagnóstico, tal como una enzima que puede ser fácilmente visualizada, tal como peroxidasa de rábano picante. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos de una sola cadena están ligados entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente sobre una sola cadena polipéptida, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

[0169] Para crear un anticuerpo de cadena simple (scFv), los fragmentos del DNA que codifican V_H y V_L son ligados operativamente con otro fragmento que codifica un engarce flexible, por ejemplo, codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de modo que las secuencias V_H y V_L pueden ser expresadas como una proteína de cadena simple contigua con los dominios V_L y V_H unidos por el engarce flexible. Vea, por ejemplo, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena simple puede ser monovalente, si se usa solamente una sola V_H y V_L, bivalente, si se usan dos V_H y V_L, o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L. Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se ligan específicamente a c-Met y a otra molécula.

[0170] En otras realizaciones, pueden prepararse otros anticuerpos modificados usando moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-c-Met. Por ejemplo, pueden prepararse "cuerpos Kappa" (Ill et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "Minicuerpos" (Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diacuerpos" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)) usando técnicas estándar de biología molecular siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

[0171] Anticuerpos biespecíficos o fragmentos que ligan antígeno pueden producirse mediante una variedad de métodos, incluyendo fusión de hibridomas o enlace de fragmentos

Fab'. Vea, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Además, anticuerpos biespecíficos pueden formarse como "diacuerpos" o "Janusinas". En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se liga a dos epítopes diferentes de c-Met. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena pesada y una primera cadena liviana del anticuerpo monoclonal 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T ó 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T y una cadena pesada y liviana de un anticuerpo adicional. En algunas realizaciones, las cadenas liviana y pesada adicionales también pueden pertenecer a uno de los anticuerpos monoclonales arriba identificados, pero son diferentes de las cadenas pesadas y livianas primeras.

[0172] En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados arriba descritos se preparan usando uno o más dominios variables o regiones CDR de un anticuerpo monoclonal anti-c-Met humano provisto por ésta.

Anticuerpos derivatizados y marcados

[0173] Un anticuerpo anti-c-Met o una porción que liga antígeno de la invención puede ser derivatizado o ligado a otra molécula (por ejemplo, otro péptido o proteína). Generalmente, los anticuerpos o una porción de los mismos son derivatizados de modo que la ligadura con c-Met no sea afectada adversamente por la derivatización o el marcado. Por lo tanto, los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención tienen la intención de incluir ambas, las formas intactas y las formas modificadas de los anticuerpos anti-c-Met humanos descritos en ésta. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede estar ligado funcionalmente (mediante enlace químico, función genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción del anticuerpo con otra molécula, tal como una región del núcleo de streptavidina o un rótulo de polihistidina.

[0174] Un tipo de anticuerpo derivatizado es producido mediante la reticulación de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos claramente separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimídico), o homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimídilo). Tales reticulantes están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0175] Otro tipo de anticuerpo derivatizado es un anticuerpo marcado. Agentes de detección útiles con los cuales puede derivatizarse un anticuerpo o una porción que liga antígeno de la invención incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina, sustancias fosforescentes a base de lantánidos y similares. Un anticuerpo también puede estar marcado con enzimas útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo está marcado con una enzima detectable, es detectado mediante el agregado de reactivos adicionales usados por la enzima para producir un producto de reacción que puede ser discernido. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, el agregado de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina lleva a un producto de reacción coloreado detectable. Un anticuerpo también puede ser marcado con biotina y ser detectado mediante medición indirecta de la ligadura de avidina o streptavidina. Un anticuerpo también puede ser marcado con un epítope polipeptídico predeterminado reconocido por un reporter secundario (por ejemplo, secuencias apareadas de cierres de leucina, sitios de ligadura para anticuerpos secundarios, dominios que ligan metales, rótulos de epítopes). En algunas realizaciones, los marcadores están unidos mediante brazos espaciadores de longitud variable para reducir el potencial de impedimento estérico.

[0176] Un anticuerpo anti-c-Met también puede estar marcado con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede ser usado tanto con propósitos diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar tumores que expresan c-Met mediante rayos x u otras técnicas de diagnóstico. Además, el radiomarcador

puede usarse terapéuticamente como una toxina para células cancerosas o tumores. Ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los radioisótopos o radionuclidos siguientes: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I e ^{131}I .

[0177] Un anticuerpo anti-c-Met también puede ser derivatizado con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo dehidrato de carbono. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la vida media en suero o para aumentar la ligadura al tejido.

Composiciones y equipos farmacéuticos

[0178] La invención se refiere a composiciones que comprenden un anticuerpo anti-c-Met con propiedades agonistas para el tratamiento de pacientes que necesitan un procedimiento terapéutico que incluye, pero no está limitado a, regeneración de tejidos o curación de heridas. En algunas realizaciones, el sujeto de tratamiento es un humano. En otras realizaciones, el sujeto es un sujeto veterinario. Ejemplos de tejidos que necesitan regeneración incluyen, pero no están limitados a, tejido del hígado (como en el caso de hepatitis o cirrosis crónica o alcohólica), tejido pulmonar, tejido del estómago (como en el caso de úlceras gástricas) y tejido del riñón (como en el caso de insuficiencia renal aguda). Los anticuerpos anti-c-Met agonistas de la invención y las composiciones que los comprenden pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos, diagnósticos o profilácticos adicionales. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más anticuerpos anti-c-Met agonistas de la invención como vacuna o como adyuvantes de una vacuna. El tratamiento puede implicar la administración de uno o más anticuerpos monoclonales anti-c-Met agonistas de la invención o de fragmentos que ligan antígeno de los mismos, solos o con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0179] En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-c-Met de la invención que tiene propiedades inhibitorias puede implicar cualquier tejido u órgano incluyendo, pero no estando limitado a, cáncer de cerebro, de pulmón, de células escamosas, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza, de cuello, de hígado, renal, de ovarios, de próstata, colorectal, de esófago, ginecológico, nasofaríngeo, o de tiroides, melanomas, linfomas, leucemias, mielomas múltiples, coreocarcinoma, neoplasia de Kaposi o cervical intraepitelial. Otros trastornos que pueden tratarse o prevenirse mediante un anticuerpo anti-c-Met de la invención que tiene propiedades inhibitorias incluyen, pero no están limitados a, vitreoretinopatía proliferativa, retinopatía diabética proliferativa, endometriosis y artritis. En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-c-Met pueden usarse para inhibir la formación de placas en la enfermedad de Alzheimer y para inhibir respuestas mitogénicas celulares. Los anticuerpos anti-c-Met de la invención pueden usarse para inhibir la implantación de embriones mediante la inclusión de un contraceptivo inyectable. Los anticuerpos anti-c-Met pueden usarse para tratar el crecimiento de tumores mediante la inhibición de proliferación, tratar/inhibir angiogénesis tumoral o para tratar la extensión/diseminación metastásica de metástasis. En particular, los anticuerpos anti-c-Met humanos de la invención con propiedades inhibitorias son útiles para tratar glioblastomas, sarcomas o carcinomas, por ejemplo, de la mama, ovarios, próstata, colon o pulmón.

[0180] El tratamiento puede implicar la administración de uno o más anticuerpos monoclonales anti-c-Met de la invención o de fragmentos que ligan antígeno de los mismos, solos o con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos anti-c-Met inhibitorios de la invención y las composiciones que los comprenden pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos, diagnósticos o profilácticos adicionales. Agentes terapéuticos adicionales incluyen otros agentes anti-neoplásicos, anti-tumorales, anti-angiogénicos o quimioterapéuticos. Tales agentes adicionales pueden estar incluidos en la misma composición o ser administrados por separado. En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más anticuerpos anti-c-Met inhibitorios de la invención como vacuna o como adyuvantes de una vacuna.

[0181] Además de vacunas contra cáncer que comprenden antígenos asociados con cáncer, las vacunas útiles en combinación con el anticuerpo incluyen, sin limitación, DNA de GM-CSF y vacunas a base de células, vacunas con células dendríticas, vacunas virales recombinantes (por ejemplo vaccinia virus) y vacunas con proteínas de golpe de calor (heat shock protein (HSP)). Vacunas útiles también incluyen vacunas con tumores, tales como aquellas formadas por células de melanoma y pueden ser autólogas o alogénicas. Las vacunas pueden ser, por ejemplo, a base de péptidos, DNA o células.

[0182] Según lo usado en ésta, "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución fisiológica, solución fisiológica buferada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, como así también combinaciones de los mismos. En muchos casos será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes de humectación o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes de humectación o emulsión, preservativos o búfferes, que aumentan la vida de estante o efectividad del anticuerpo.

[0183] Las composiciones de esta invención pueden estar en varias formas, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y de infusión), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración deseado y de la aplicación terapéutica. Composiciones preferidas típicas están en la forma de soluciones inyectables o de infusión, tales como las composiciones similares a aquellas usadas para la inmunización pasiva de humanos. El modo de administración preferido es el parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

[0184] Composiciones terapéuticas típicas deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de droga. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un anticuerpo anti-c-Met en la cantidad requerida de un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes arriba enumerados, según lo requerido, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre aquellos arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización que provee un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de tales ingredientes. Puede mantenerse la fluidez apropiada de una solución, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante la manutención del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de agentes tensoactivos. Puede lograrse una absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0185] Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos por el arte, si bien la ruta/modo preferido de administración para muchas aplicaciones terapéuticas es la infusión subcutánea, intramuscular o intravenosa. Como será apreciado por el entendido en el arte, la ruta y/o modo de administración variará en dependencia de los resultados deseados.

[0186] En ciertas realizaciones, el compuesto activo de las composiciones de anticuerpo puede ser preparado con un excipiente que protegerá el anticuerpo contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como vinilacetato de etileno, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o generalmente conocidos por los entendidos en el arte. Vea, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

[0187] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-c-Met de la invención puede ser administrado oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un excipiente comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si deseado) también puede ser encerrado en una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimido en tabletas o incorporado directamente en

la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los anticuerpos anti-c-Met pueden ser incorporados con excipientes y ser usados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante otro tipo de administración que la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

[0188] También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos adicionales. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Met de la invención es co-formulado con y/o co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes incluyen, sin limitación, anticuerpos que ligan otros objetivos, agentes antineoplásicos, agentes antitumorales, agentes quimioterapéuticos, análogos peptídicos que inhiben c-Met, o anticuerpos u otras moléculas que se ligan a HGF y previenen su ligadura con, o la activación de, c-Met. Tales terapias de combinación pueden requerir dosificaciones menores del anticuerpo anti-c-Met inhibitorio como así también de los agentes co-administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con varias monoterapias.

[0189] Los anticuerpos anti-c-Met inhibitorios de la invención y las composiciones que los comprenden también pueden administrarse en combinación con otros regímenes terapéuticos, particularmente en combinación con un tratamiento de radiación.

[0190] En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-c-Met activante o inhibitorio de la invención es co-formulado con y/o co-administrado con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En el caso de un anticuerpo anti-c-Met activante, estos agentes incluyen, sin limitación, uno o más agentes químicos que activan c-Met y/o otros agentes conocidos en el arte para intensificar un procedimiento terapéutico tal como regeneración de tejidos o curación de heridas. En el caso de un anticuerpo inhibitorio, estos agentes incluyen aquellos que inhiben c-Met. Además, tales terapias de combinación también pueden usarse para tratar enfermedades como arteriosclerosis obliterans, fibrosis tubulointersticial renal, úlceras refractarias de la piel, úlceras gástricas o problemas asociados con trasplantes. Tales terapias de combinación pueden requerir dosificaciones menores del anticuerpo anti-c-Met inhibitorio o agonista como así también de los agentes co-administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las varias monoterapias.

[0191] Las composiciones de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o una porción que liga antígeno de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una cantidad con la cual se compensan efectos tóxicos o perniciosos cualesquiera del anticuerpo o porción de anticuerpo mediante los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos previo a, o en una etapa anterior de, la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva puede ser menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

[0192] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, varias dosis divididas durante un período de tiempo, o la dosis puede ser reducida o aumentada proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en la forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. "Forma de unidad de dosificación", según lo usado en ésta, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el tratamiento de sujetos mamíferos; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el excipiente farmacéutico requerido. La especificación de las formas de unidad de dosificación de la invención es dictada por, y directamente dependiente de, (a) las características únicas del anticuerpo anti-c-Met o la porción del mismo y del efecto terapéutico o profiláctico particular a

ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes al arte de formular la composición de tal anticuerpo para el tratamiento de la enfermedad en individuos.

[0193] Una gama típica, no limitante, para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención es 0,025 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1 a 50 mg/kg, más preferentemente 0,1-25, 0,1 a 10 ó 0,1 a 3 mg/kg. En algunas realizaciones, una formulación contiene 5 mg/ml de anticuerpo en un búffer de citrato de sodio 20 mM, pH 5,5, NaCl 140 mM y 0,2 mg/ml de polisorbato 80. Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a ser aliviada. Debe entenderse, además, que para cualquier sujeto particular deben ajustarse regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo, de acuerdo con la necesidad del individuo y la evaluación profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que las gamas de dosificación establecidas en ésta son dadas solamente a modo de ejemplo y no tienen la intención de limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

[0194] Otro aspecto de la presente invención provee equipos que comprenden un anticuerpo anti-c-Met o un porción de anticuerpo de la invención o una composición que comprende tal anticuerpo. Un equipo puede incluir, además del anticuerpo o la composición, agentes diagnósticos o terapéuticos. Un equipo también puede incluir instrucciones de uso para un método diagnóstico o terapéutico. En una realización preferida, el equipo incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y un agente diagnóstico que puede ser usado en un método descrito más abajo. En otra realización preferida, el equipo incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden ser usados en un método descrito más abajo.

[0195] Esta invención también se refiere a composiciones para inhibir el crecimiento celular anormal en un mamífero, composición que comprende una cantidad de un anticuerpo de la invención en combinación con una cantidad de un agente quimioterapéutico, donde las cantidades de compuesto, sal, solvato o prodroga y del agente quimioterapéutico son conjuntamente efectivas para inhibir un crecimiento celular anormal. Actualmente el arte conoce muchos agentes quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es seleccionado del grupo formado por inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, antibióticos de intercalado, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas, por ejemplo, anti-andrógenos y agentes anti-angiogénesis.

[0196] Agentes de anti-angiogénesis, tales como inhibidores de MMP-2 (matriz-metaloproteinasas 2), inhibidores de MMP-9 (matriz-metaloproteinasas 9) e inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II) pueden usarse conjuntamente con un anticuerpo anti-c-Met de la invención. Ejemplos de inhibidores COX-II útiles incluyen CELEBREXTM (celecoxib), valdecoxib y rofecoxib. Ejemplos de inhibidores de matriz-metaloproteinasas útiles se describen en WO 96/33172 (publicada el 24 de octubre de 1996), WO 96/27583 (publicada el 7 de marzo de 1996), Solicitud de Patente Europea No. 97304971.1 (solicitada el 8 de julio de 1997), Solicitud de Patente Europea No. 99308617.2 (solicitada el 29 de octubre de 1999), WO 98/07697 (publicada el 26 de febrero de 1998), WO 98/03516 (publicada el 29 de enero de 1998), WO 98/34918 (publicada el 13 de agosto de 1998), WO 98/34915 (publicada el 13 de agosto de 1998), WO 98/33768 (publicada el 6 de agosto de 1998), WO 98/30566 (publicada el 16 de julio de 1998), Publicación de Patente Europea 606,046 (publicada el 13 de julio de 1994), Publicación de Patente Europea 931.788 (publicada el 28 de julio de 1999), WO 90/05719 (publicada el 31 de mayo de 1990), WO 99/52910 (publicada el 21 de octubre de 1999), WO 99/52889 (publicada el 21 de octubre de 1999), WO 99/29667 (publicada el 17 de junio de 1999), Solicitud Internacional PCT No. PCT/IB98/01113 (solicitada el 21 de julio de 1998), Solicitud de Patente Europea No. 99302232.1 (solicitada el 25 de marzo de 1999), solicitud de patente de Gran Bretaña número 9912961.1 (solicitada el 3 de junio de 1999), Solicitud Provisional U.S. No. 60/148,464 (solicitada el 12 de agosto de 1999), Patente U.S. 5.863.949 (concedida el 26 de enero de 1999), Patente U.S. 5.861.510 (concedida el 19 de enero de 1999), y Publicación de Patente Europea 780.386 (publicada el 25 de junio de 1997), todas las cuales están incorporadas en ésta en su totalidad por referencia.

[0197] Inhibidores de MMP preferidos son aquellos que no muestran artralgia. Más preferidos son aquellos que inhiben selectivamente MMP-2 y/o MMP-9 con relación a las otras matriz-metaloproteinasas (es decir, MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-

10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13). Algunos ejemplos específicos de inhibidores de MMP útiles en la presente invención son AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830, y los compuestos enumerados en la lista siguiente: ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenesulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclopentil)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octan-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(2-cloro-4-fluoro-benciloxi)-bencensulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclobutil)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 4-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico; hidroxiamida del ácido (R) 3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahidro-piran-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido (2R, 3R) 1-[4-(4-fluoro-2-metil-benciloxi)-bencensulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-1-metil-etil)-amino]-propiónico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonil]-(4-hidroxicarbamoil-tetrahidro-piran-4-il)-amino]-propiónico; hidroxiamida del ácido 3-exo-3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octan-3-carboxílico; hidroxiamida del ácido 3-endo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octan-3-carboxílico; y hidroxiamida del ácido (R) 3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencensulfonilamino]-tetrahidro-furan-3-carboxílico; y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

[0198] Un anticuerpo anti-c-Met de la invención también puede usarse con inhibidores de transducción de señales, tales como agentes que pueden inhibir respuestas al EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico), incluyendo, pero no estando limitado a, anticuerpos de EGF-R, anticuerpos de EGF y moléculas que son inhibidores de EGF-R; inhibidores del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y del receptor del VEGF (VEGF-R); e inhibidores del receptor erbB2, tales como moléculas orgánicas o anticuerpos que se ligan al receptor erbB2, por ejemplo, HERCEPTIN™ (Genentech, Inc.). Los inhibidores del EGF-R se describen, por ejemplo, en WO 95/19970 (publicada el 27 de julio de 1995), WO 98/14451 (publicada el 9 de abril de 1998), WO 98/02434 (publicada el 22 de enero de 1998), y la Patente de los Estados Unidos 5.747.498 (concedida el 5 de mayo de 1998), todas incorporadas en ésta por referencia, y tales sustancias pueden usarse en la presente invención según lo descrito en ésta.

[0199] Los agentes inhibidores del EGF-R incluyen, pero no están limitados a, los anticuerpos monoclonales C225 y anti-EGF-R 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. y Merck KgaA), y los compuestos ZD-1834, ZD-1838 e IRESSA™ (ZD-1839) (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomida (Farmacia/Sugen), Tarceva™ (OSI, Roche y Genetech), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183,805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387,785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Farmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusión EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) y Vacuna EGF-R (York Medical/Centro de Immunología Molecular (CIM)). Estos y otros agentes inhibidores de EGF-R pueden usarse en la presente invención.

[0200] Los inhibidores de VEGF-R y VEGF, por ejemplo SU-5416, SU-11248 y SU-6668 (Sugen Inc.), SH-268 (Schering) y NX-1838 (NeXstar) también pueden combinarse con los compuestos de la presente invención. Los inhibidores de VEGF y VEGF-R se describen en, por ejemplo, WO 99/24440 (publicada el 20 de mayo de 1999), Solicitud Internacional PCT PCT/IB99/00797 (solicitada el 3 de mayo de 1999), WO 95/21613 (publicada el 17 de agosto de 1995), WO 99/61422 (publicada el 2 de diciembre de 1999), Patente de los Estados Unidos 5.834.504 (concedida el 10 de noviembre de 1998), WO 98/50356 (publicada el 12 de noviembre de 1998), Patente de los Estados Unidos 5.883.113 (concedida el 16 de marzo de 1999), Patente de los Estados Unidos 5.886.020 (concedida el 23 de marzo de 1999), Patente de los Estados Unidos 5.792.783 (concedida el 11 de agosto de 1998), WO 99/10349 (publicada el 4 de marzo de 1999), WO 97/32856 (publicada el 12 de setiembre de 1997), WO 97/22596 (publicada el 26 de junio de 1997), WO 98/54093 (publicada el 3 de diciembre de

1998), WO 98/02438 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 99/16755 (publicada el 8 de abril de 1999), y WO 98/02437 (publicada el 22 de enero de 1998), todas las cuales están incorporadas en ésta en su totalidad por referencia.

[0201] Otros ejemplos de algunos inhibidores específicos de VEGF-R y VEGF útiles en la presente invención son IM862 (Cytran Inc.); Avastin™; y angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme y Chiron. Estos y otros inhibidores de VEGF y VEGF-R pueden usarse en la presente invención según lo descrito en ésta.

[0202] Los inhibidores del receptor erbB2, tales como GW-282974 (Glaxo Wellcome plc), y los anticuerpos monoclonales AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) y 2B-1 (Chiron) pueden ser combinados además con los compuestos de la invención, por ejemplo aquellos indicados en WO 98/02434 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 99/35146 (publicada el 15 de julio de 1999), WO 99/35132 (publicada el 15 de julio de 1999), WO 98/02437 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 97/13760 (publicada el 17 de abril de 1997), WO 95/19970 (publicada el 27 de julio de 1995), Patente de los Estados Unidos 5.587.458 (concedida el 24 de diciembre de 1996), y Patente de los Estados Unidos 5.877.305 (concedida el 2 de marzo de 1999), todas las cuales están incorporadas en ésta en su totalidad por referencia. Los inhibidores del receptor erbB2 útiles en la presente invención también se describen en la Patente de los Estados Unidos 6.465.449 (concedida el 15 de octubre de 2002), y en la Patente de los Estados Unidos 6.284.764 (concedida el 4 de setiembre de 2001), incorporadas en ésta por referencia. Los compuestos inhibidores del receptor erbB2 y las sustancias descritas en los documentos de patente arriba mencionados, como así también otros compuestos y sustancias que inhiben el receptor erbB2, pueden ser usados con el compuesto de la presente invención de acuerdo con la presente invención.

[0203] Un anticuerpo anti-c-Met de la invención también puede usarse con inhibidores de PDGFR, BCR-ABL o c-kit tal como Gleevec™ (Novartis).

[0204] Un anticuerpo anti-c-Met de la invención también puede ser usado con anticuerpos anti-IGF-IR tales como aquellos descritos en WO 02053596 (publicada el 11 de julio de 2002), por ejemplo un anticuerpo que tiene la secuencia del anticuerpo 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2 ó 4.17.3. El anticuerpo de la invención también puede ser usado con anticuerpos CTLA-4, tales como aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos 6.682.736, incluyendo un anticuerpo que tiene la secuencia del anticuerpo 3.1.1, 4.1.1, 4.8.1, 4.10.2, 4.13.1, 4.14.3, 6.1.1, 11.2.1, 11.6.1, 11.7.1, 12.3.1.1 ó 12.9.1.1. El anticuerpo también puede usarse con anticuerpos CD40, tales como aquellos descritos en WO03040170 publicada el 15 de mayo de 2003, incluyendo uno que tiene la secuencia del anticuerpo 3.1. 1, 3. 1.1H-A78T, 3.1. 1H-A78T-V88A-V97A, 7.1. 2, 10.8.3, 15.1. 1, 21. 4.1, 21.2. 1, 22. 1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5. 1, 23. 25.1, 23.28. 1, 23. 28.1H-D16E, 23.29. 1 ó 24.2. Los anticuerpos también pueden combinarse con agentes anti-integrina, tales como anticuerpos anti-integrina.

[0205] Algunos ejemplos específicos de agentes con los cuales puede combinarse el anticuerpo incluyen los siguientes: (1) los agentes de alquilación N-óxido de nitrógeno mostaza, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalano, busulfanmitobronitol, carbocona, tiotepa, ranimustina, nimustina y temozolomida; (2) los anti-metabolitos metotrexato, 6-mercaptopurina, ribosida, mercaptopurina, 5-FU, tegafur, doxifluridina, carmofur, citarabina, ocfosfato, enocitabina, S-1, Gemcitabina, Fludarabina y Capecitabina; (3) los antibióticos actinomicina D, doxorubicina, daunorubicina, neocarcinostatina, bleomicina, peplomicina, mitomicina C, aclarubicina, pirarubicina, epirubicina, cinostatina, stimalamer e idarubicina; (4) los agentes antitumorales derivados de plantas vincristina, vinblastina, vindeshina, etoposida, sobuzoxano, docetaxel, paclitaxel y vinorelbina; (5) los compuestos de coordinación de platino cisplatino, carboplatino, nedaplatino y oxaliplatino; (6) los derivados de camptotecina irinotecano, topotecano y camptotecina; (7) los inhibidores de tirosina quinasa Iressa™ (gefitinib) y SU5416; (8) agentes anti-CD20 tales como Rituxan™ (Rituximab), Bexxar (tositumomab) y Zevalin™ (Ibritumomab tiuxetan); (9) los interferones interferon alfa, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, interferon beta, interferon gamma-1a e interferon gamma-n1; (10) los modificadores de respuesta biológica biological response modifiers creстина, lentinano, sizofirano, picibanil y ubenimex; o (11) otros agentes antitumorales como mitoxantrona, l-asparaginasa, procarbazona, dacarbazina, hidroxycarbamida, pentostatina y Tretinoina. Además, el anticuerpo de la invención puede combinarse con agentes anticancerígenos tales como exemestano, Edotecarin™ (J-107088) y SU11248.

Métodos diagnósticos usados

[0206] En otro aspecto, la invención provee métodos diagnósticos. Los anticuerpos anti-c-Met pueden usarse para detectar c-Met en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*. En una realización, la invención provee un método para diagnosticar la presencia o ubicación de un tumor que expresa c-Met en un sujeto que necesita tal diagnóstico, método que comprende las etapas de inyectar el anticuerpo en el sujeto, determinar la expresión de c-Met en el sujeto mediante la localización del sitio de ligadura del anticuerpo, comparar la expresión en el sujeto con aquella de un sujeto de referencia normal o estándar y diagnosticar la presencia o ubicación del tumor.

[0207] Los anticuerpos anti-c-Met pueden usarse en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ensayo ELISA, un ensayo RIA, citometría de flujo, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia de Western o inmunoprecipitación. Los anticuerpos de la invención anti-c-Met pueden usarse para detectar c-Met de humanos. En otra realización, los anticuerpos anti-c-Met pueden usarse para detectar c-Met de monos cynomologus o monos rhesus. En otra realización, los anticuerpos anti-c-Met pueden usarse para detectar c-Met de ratas.

[0208] La invención provee un método para detectar c-Met en una muestra biológica, método que comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-c-Met de la invención y detectar el anticuerpo ligado. En una realización, el anticuerpo anti-c-Met está marcado directamente con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met (el primer anticuerpo) no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede ligar al anticuerpo anti-c-Met está marcado. Como es bien conocido por un entendido en el arte, se elige un segundo anticuerpo que sea capaz de ligar específicamente la especie y clase particular del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-c-Met es una IgG humana, el segundo anticuerpo puede ser una IgG anti-humana. Otras moléculas que pueden ligarse con anticuerpos incluyen, sin limitación, Proteína A y Proteína G, ambas disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pierce Chemical Co.

[0209] Marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se han revelado supra, e incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen streptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

[0210] En otras realizaciones, c-Met puede ensayarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición utilizando estándares de c-Met marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-c-Met no marcado. En este ensayo se combinan la muestra biológica, los estándares de c-Met marcados y el anticuerpo anti-c-Met, y se determina la cantidad de c-Met estándar marcado ligada al anticuerpo no marcado. La cantidad de c-Met en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de c-Met estándar marcado ligada al anticuerpo anti-c-Met.

[0211] Los inmunoensayos arriba expuestos pueden usarse para varios propósitos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-c-Met pueden usarse para detectar c-Met en células cultivadas. En una realización preferida, los anticuerpos anti-c-Met se usan para determinar la cantidad de c-Met sobre la superficie de células que han sido tratadas con varios compuestos. Este método puede usarse para identificar compuestos que modulan niveles de la proteína c-Met. De acuerdo con este método, una muestra de células se trata con un compuesto de ensayo durante un período de tiempo, mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si desea medirse el nivel total de c-Met, las células se someten a lisis y se mide el nivel total de c-Met usando uno de los inmunoensayos descritos precedentemente. El nivel total de c-Met en las células tratadas se compara con el nivel de c-Met en las células no tratadas para determinar el efecto del compuesto de ensayo.

[0212] Un inmunoensayo preferido para medir niveles totales de c-Met es citometría de flujo o inmunohistoquímica. Si desea medirse el nivel de c-Met en la superficie celular, las células no se someten a lisis y se miden los niveles de c-Met en la superficie celular, usando uno de los inmunoensayos descritos precedentemente. Un inmunoensayo preferido para determinar niveles de c-Met en la superficie celular incluye las etapas de marcar las proteínas de la

superficie celular con un marcador detectable, tal como biotina o ^{125}I , inmunoprecipitar el c-Met con un anticuerpo anti-c-Met y detectar luego el c-Met marcado.

[0213] Otro inmunoensayo preferido para determinar la ubicación de c-Met, por ejemplo, los niveles en la superficie celular, usa inmunohistoquímica. Un inmunoensayo preferido para detectar niveles de c-Met en la superficie celular incluye ligar un anticuerpo anti-c-Met marcado con un fluoróforo apropiado, tal como fluoresceína o ficoeritrina, y detectar el anticuerpo primario usando citometría de flujo. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met no está marcado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede ligar el anticuerpo anti-c-Met está marcado. Métodos tales como ELISA, RIA, citometría de flujo, transferencia de Western, inmunohistoquímica, marcado en la superficie celular de proteínas de la membrana integral e inmunoprecipitación son bien conocidos en el arte. Vea, por ejemplo, Harlow y Lane, supra. Además, los inmunoensayos pueden realizarse en mayor escala para una clasificación de alto rendimiento, con el fin de ensayar un gran número de compuestos, ya sea para la activación o inhibición de c-Met.

[0214] Los anticuerpos anti-c-Met de la invención también pueden usarse para determinar los niveles de c-Met en un tejido o en células derivadas del tejido. En algunas realizaciones, el tejido es un tejido enfermo. En algunas realizaciones, el tejido es un tumor o una biopsia del mismo. En algunas realizaciones del método, un tejido o una biopsia del mismo es extirpado de un paciente. Luego, el tejido o biopsia se usa en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, niveles totales de c-Met, niveles de c-Met en la superficie celular o la ubicación de c-Met mediante métodos discutidos precedentemente.

[0215] El método diagnóstico arriba descrito puede usarse para determinar si un tumor expresa elevados niveles de c-Met, lo que podría indicar que el tumor es un objeto para el tratamiento con anticuerpo anti-c-Met. El método diagnóstico también puede usarse para determinar si un tejido o célula expresa niveles insuficientes de c-Met o c-Met activado, siendo por lo tanto un candidato para el tratamiento con anticuerpos anti-c-Met activantes, HGF y/u otros agentes terapéuticos para aumentar los niveles o la actividad de c-Met.

[0216] Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse *in vivo* para identificar tejidos y órganos que expresan c-Met. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-c-Met se usan para identificar tumores que expresan c-Met. Una ventaja de usar los anticuerpos anti-c-Met humanos de la presente invención consiste en que los anticuerpos pueden usarse *in vivo* con seguridad sin provocar una respuesta inmune substancial al anticuerpo después de la administración, a diferencia de los anticuerpos de origen no humanos o anticuerpos humanizados o quiméricos.

[0217] El método comprende las etapas de administrar un anticuerpo anti-c-Met marcado en forma detectable o una composición que lo comprende a un paciente que necesita tal ensayo diagnóstico y someter al paciente a un análisis por imagen para determinar la ubicación de los tejidos que expresan c-Met. El análisis por imagen es bien conocido por el arte médico, e incluye, sin limitación, análisis con rayos x, diagnóstico por imagen con resonancia magnética (MRI) o tomografía computada (CT). El anticuerpo puede marcarse con cualquier agente adecuado para diagnóstico por imagen *in vivo*, por ejemplo un agente de contraste, tal como bario, que puede usarse para análisis con rayos x, o un agente de contraste magnético, tal como un quelato de gadolinio, que puede usarse para MRI o CT. Otros agentes de marcado incluyen, sin limitación, radioisótopos, tal como ^{99}Tc . En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met no estará marcado y será diagnosticado por imagen mediante la administración de un segundo anticuerpo u otra molécula que sea detectable y que pueda ligar el anticuerpo anti-c-Met. En una realización, se obtiene una biopsia del paciente para determinar si el tejido de interés expresa c-Met.

Métodos terapéuticos usados

[0218] En otra realización, la invención provee un método para inhibir la actividad de c-Met mediante la administración de un anticuerpo anti-c-Met a un paciente que lo necesita. En otra realización, la invención provee un método para activar la actividad de c-Met mediante la administración de un anticuerpo anti-c-Met a un paciente que lo necesita. Cualquiera de los tipos de anticuerpos descritos en ésta puede usarse terapéuticamente. En una realización preferida, el anticuerpo anti-c-Met es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. En otra realización preferida, el c-Met es humano y el paciente es un paciente humano. Alternativamente, el paciente puede ser un mamífero que expresa un c-Met con el cual el anticuerpo anti-c-Met reacciona en forma cruzada. El anticuerpo puede ser administrado a un

mamífero no humano que expresa un c-Met con el cual el anticuerpo reacciona en forma cruzada (es decir, de una rata o un mono cynomologus) con propósitos veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de esta invención.

[0219] Según lo usado en ésta, el término "un trastorno en el cual la actividad de c-Met es pernicioso" incluye enfermedades y otros trastornos en los cuales la presencia de elevados niveles de c-Met en un sujeto que sufre del trastorno mostró ser, o supuestamente es, responsable por la patofisiología del trastorno o es un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. Tales trastornos pueden ser puestos en evidencia, por ejemplo, por un aumento en los niveles de c-Met sobre la superficie celular o por la autofosforilación aumentada de la tirosina de c-Met en las células o los tejidos afectados de un sujeto que sufre el trastorno. El aumento de niveles de c-Met puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-c-Met según lo descrito precedentemente.

[0220] En una realización, un anticuerpo anti-c-Met puede administrarse a un paciente que tiene un tumor que expresa c-Met. Un tumor puede ser un tumor sólido o puede ser un tumor no sólido, tal como un linfoma. En una realización más preferida, un anticuerpo anti-c-Met puede administrarse a un paciente que tiene un tumor que expresa c-Met que es canceroso. En una realización aún más preferida, el anticuerpo anti-c-Met se administra a un paciente que tiene un tumor que expresa c-Met de pulmón, mama, próstata o colon. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-c-Met se administra a un paciente que tiene un tumor de glioblastoma que expresa c-Met. En una realización altamente preferida, el método causa que el tumor no aumente en peso o volumen o que disminuya en peso o volumen. En otra realización, el método previene la ligadura de HGF a c-Met sobre la superficie de las células tumorosas o resulta en una disminución de la proteína c-Met en la superficie celular. En una realización preferida, el anticuerpo se selecciona entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3; 13.3.2H-A14P; 13.3.2H-E42K; 13.3.2H-A14P,E42K; 13.3.2H-S97T; 13.3.2H-E42K,S97T; 13.3.2H-A14P,E42K,S97T; 13.3.2L-A91T; 13.3.2L-A91T,H-A14P; 13.3.2L-A91T,H-E42K; 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K; 13.3.2L-A91T,H-E42K,S97T ó 13.3.2L-A91T,H-A14P,E42K,S97T, o comprende una cadena pesada, una cadena liviana o una región que liga antígeno de los mismos.

[0221] En otra realización preferida, un anticuerpo anti-c-Met puede administrarse a un paciente que expresa niveles inapropiadamente elevados de c-Met. El arte conoce que la expresión de niveles elevados de c-Met puede llevar a una variedad de cánceres comunes. En una realización, tal método se refiere al tratamiento de cáncer, tal como cáncer de cerebro, de células escamosas, de vejiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeza y cuello, esofágico, de próstata, colorectal, de pulmón, renal, de riñón, de ovarios, ginecológico o de tiroides. Pacientes que pueden tratarse con un compuesto de la invención de acuerdo con los métodos de esta invención incluyen, por ejemplo, pacientes a los cuales se ha diagnosticado o que tienen cáncer de pulmón, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y de cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer estomacal, cáncer del colon, cáncer de las mamas, tumores ginecológicos (por ejemplo, sarcomas uterinos, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma cervical, carcinoma de la vagina o carcinoma de la vulva), enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endócrino (por ejemplo, cáncer de las glándulas tiroide, paratiroide o adrenal), sarcomas de los tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, tumores sólidos de la niñez, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o de la uretra (por ejemplo, carcinoma de las células renales, especialmente carcinomas de las células renales papilares hereditarios y esporádicos que tienen mutaciones activantes en el dominio de la quinasa de c-Met, carcinoma de la pelvis renal), o neoplasmas del sistema nervioso central (por ejemplo, linfoma del sistema nervioso central (CNS) primario, tumores del eje espinal, gliomas del tronco cerebral o adenomas pituitarios). En una realización más preferida, el anticuerpo anti-c-Met se administra a un paciente con cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon o un glioblastoma. En una realización aún más preferida, el método causa la detención de la proliferación anormal, el aumento del peso o volumen o la disminución del peso o volumen del tumor debido al cáncer.

[0222] El anticuerpo puede administrarse una sola vez, pero más preferentemente se

administra varias veces. El anticuerpo puede administrarse de tres veces por día a una vez cada seis meses o período mayor. La administración puede realizarse según un programa tal como tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. También puede administrarse el anticuerpo en forma continua vía una minibomba. El anticuerpo puede administrarse vía ruta oral, mucosal, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral o tópica. El anticuerpo puede administrarse en el sitio del tumor, dentro del tumor o en un sitio distante del sitio del tumor. El anticuerpo puede administrarse una vez, al menos dos veces o al menos durante el período de tiempo necesario para tratar, paliar o curar la condición. Generalmente el anticuerpo será administrado mientras que el tumor esté presente, siempre que el anticuerpo tenga el efecto de detener el crecimiento o disminuir el peso o volumen del tumor. Generalmente el anticuerpo será administrado como parte de una composición farmacéutica como la descrita *supra*. La dosificación del anticuerpo estará generalmente en la gama de 0,1-100 mg/kg, más preferentemente 0,5-50 mg/kg, más preferentemente 1-20 mg/kg y aún más preferentemente 1-10 mg/kg. La concentración del anticuerpo en suero puede medirse mediante cualquier método conocido en el arte.

[0223] En otro aspecto, el anticuerpo anti-c-Met puede co-administrarse con otros agentes terapéuticos, tales como drogas o moléculas anti-neoplásicas, a un paciente que tiene un trastorno hiperproliferativo, tal como un cáncer o un tumor. En un aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento del trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención en combinación con un agente antitumoral seleccionado del grupo formado por, pero no limitado a, inhibidores mitóticos, agentes de alquilación, anti-metabolitos, agentes de intercalado, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, inhibidores de quinasa, inhibidores de matriz metaloproteasa, productos terapéuticos genéticos y anti-andrógenos. En una realización más preferida, el anticuerpo puede administrarse con un agente antineoplásico, tal como adriamicina o taxol. En otra realización preferida, el anticuerpo o la combinación terapéutica se administra conjuntamente con radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otra inmunoterapia. En aún otra realización preferida, el anticuerpo será administrado conjuntamente con otro anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-c-Met puede administrarse conjuntamente con un anticuerpo u otro agente conocido por inhibir tumores o la proliferación de células cancerosas, por ejemplo, un anticuerpo o agente que inhibe el receptor erbB2, EGF-R, CD20 o VEGF.

[0224] La co-administración del anticuerpo con un agente terapéutico adicional (terapia de combinación) incluye administrar una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-c-Met y el agente terapéutico adicional como así también administrar dos o más composiciones farmacéuticas por separado, una que comprende el anticuerpo anti-c-Met y la otra (las otras) que comprende(n) el agente (los agentes) terapéutico(s) adicional(es). Además, si bien co-administración o terapia combinatoria significa generalmente administrar el anticuerpo y los agentes terapéuticos adicionales simultáneamente, también incluye casos en los cuales el anticuerpo y los agentes terapéuticos adicionales son administrados en tiempos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse una vez cada tres días, mientras que el agente terapéutico se administra una vez por día. Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse antes o después del tratamiento del trastorno con el agente terapéutico adicional, por ejemplo, después de que fracasó la terapia con el agente adicional.

Similarmente, el anticuerpo anti-c-Met puede administrarse antes o después de otra terapia, tales como radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otra inmunoterapia.

[0225] El anticuerpo y uno o más agentes terapéuticos adicionales (la terapia combinatoria) pueden administrarse una vez, dos veces o al menos durante el período de tiempo necesario para tratar, paliar o curar la condición. Preferentemente, la terapia de combinación se administra varias veces. La terapia combinatoria puede administrarse desde tres veces por día a una vez cada seis meses. La administración puede realizarse según un programa tal como tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses, o puede administrarse

en forma continua vía una minibomba. La terapia de combinación puede administrarse vía ruta oral, mucosal, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral o tópica. La terapia combinatoria puede administrarse en un sitio distante del sitio del tumor. Generalmente la terapia de combinación será administrada mientras que el tumor esté presente, siempre que el anticuerpo tenga el efecto de detener el crecimiento o disminuir el peso o volumen del tumor.

[0226] En aún otra realización, el anticuerpo anti-c-Met está marcado con un radiomarcador, una inmunotoxina o toxina, o es una proteína de fusión que comprende un péptido tóxico. El anticuerpo anti-c-Met o la proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-c-Met dirige el radiomarcador, inmunotoxina, toxina o péptido tóxico hacia el tumor o célula cancerosa que expresa c-Met. En una realización preferida, el radiomarcador, inmunotoxina, toxina o péptido tóxico se internaliza después de que el anticuerpo anti-c-Met se liga con el c-Met sobre la superficie del tumor o célula cancerosa.

[0227] En otro aspecto, el anticuerpo anti-c-Met puede usarse para tratar enfermedades o condiciones no cancerosas asociadas con c-Met. En una realización, el método comprende la etapa de administrar un anticuerpo anti-c-Met a un paciente que se encuentra en un estado patológico no canceroso o exacerbado por la actividad de c-Met. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-c-Met lentifica el progreso del estado patológico no canceroso. En una realización más preferida, el anticuerpo anti-c-Met detiene o invierte, al menos en parte, el estado patológico no canceroso.

[0228] En otro aspecto, la invención provee un método para administrar un anticuerpo anti-c-Met activante a un paciente que lo necesita. En algunas realizaciones, el anticuerpo activante o una composición farmacéutica que lo comprende se administra a un paciente que lo necesita en una cantidad efectiva para aumentar la actividad c-Met. En una realización preferida, el anticuerpo activante es capaz de restaurar la actividad normal de c-Met. En otra realización preferida, el anticuerpo activante puede administrarse a un paciente que necesita la regeneración de un tejido. En otra realización, el anticuerpo activante puede administrarse a un paciente para tratar fibrosis renal o tubulointerstitial. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met activante puede administrarse a un paciente para tratar problemas asociados con cirugía de trasplante, por ejemplo, para tratar isquemia asociada con rechazo del trasplante de riñón. En otra realización, el anticuerpo activante puede usarse para atenuar la toxicidad asociada con el tratamiento con ciclosporinas después de la cirugía de trasplante. En otra realización, el anticuerpo anti-c-Met activante puede administrarse para tratar infarto del miocardio, isquemia cardíaca debido a daños por reperfusión, restenosis después de angioplastia, o enfermedades vasculares tal como arteriosclerosis obliterans. En otra realización, el anticuerpo activante puede administrarse para curar una herida, por ejemplo, úlceras refractarias de la piel o para tratar úlceras gástricas. En otra realización preferida, el anticuerpo activante puede administrarse conjuntamente con uno o más factores adicionales que intensifican un procedimiento terapéutico tal como una regeneración de tejidos o que intensifican la actividad de c-Met. Tales factores incluyen factores de crecimiento tales como HGF y/o análogos de HGF que activan c-Met. En una realización preferida, el anticuerpo se selecciona entre 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2; 8.90.3, variantes de los mismos o comprende una cadena pesada, cadena liviana o porción que liga antígeno de los mismos.

Terapia con genes

[0229] Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden administrarse a un paciente que lo necesita vía terapia con genes. La terapia puede ser o *in vivo* o *ex vivo*. En una realización preferida, se administran a un paciente moléculas de ácido nucleico que codifican ambas, una cadena pesada y una cadena liviana. En una realización más preferida, las moléculas de ácido nucleico se administran de modo tal que se integran en forma estable en los cromosomas de células B, debido a que estas células están especializadas para producir anticuerpos. En una realización preferida, células B precursoras se transfectan o infectan *ex vivo* y se re-transplantan en un paciente que lo necesita. En otra realización, células B precursoras u otras células se infectan *in vivo* usando un virus conocido por infectar el tipo celular de interés. Vectores típicos usados para terapia con genes incluyen liposomas, plásmidos y vectores virales. Vectores virales típicos son retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados. Después de la infección *in vivo* o *ex vivo*, pueden monitorearse los niveles de expresión del anticuerpo tomando una muestra del paciente tratado y usando cualquier

inmunoensayo conocido en el arte o discutido en ésta.

[0230] En una realización preferida, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-c-Met y expresar la molécula de ácido nucleico. En otra realización, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena liviana o una porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-c-Met y expresar la molécula de ácido nucleico. En un método más preferido, el método de terapia con genes comprende las etapas de administrar una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o una porción que liga antígeno de la misma y una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena liviana o la porción que liga antígeno de la misma de un anticuerpo anti-c-Met de la invención y expresar las moléculas de ácido nucleico. El método de terapia con genes también puede comprender la etapa de administrar otro agente anti-cáncer, tales como taxol o adriamicina.

[0231] Con el fin de un mejor entendimiento de esta invención, se exponen los ejemplos siguientes. Estos ejemplos tienen solamente el propósito de ilustración y no deben ser interpretados como limitativos de cualquier modo del alcance de la invención.

EJEMPLO I

Generación de hibridomas que producen anticuerpos anti-c-Met

[0232] Se prepararon, seleccionaron y ensayaron anticuerpos de la invención como sigue: Ratones XenoMouse™ de ocho a diez semanas se inmunizaron intraperitonealmente o en las plantas de sus patas traseras con una proteína de fusión del dominio extracelular de c-Met (10 µg/dosis/ratón) (R&D Systems, Catálogo #358MT) o con una línea transfectada NIH-3T3 que expresa c-Met humano sobre su membrana plasmática (10 x 10⁶ células/dosis/ratón). Esta dosis se repitió cinco a siete veces durante un período de tres a ocho semanas. Cuatro días antes de la fusión, se administró a los ratones una inyección final de la proteína de fusión del dominio extracelular de c-Met humano en PBS. Los linfocitos del bazo y del nodo linfático de los ratones inmunizados se fusionaron con la línea celular no secretoria del mieloma P3-X63-Ag8.653, y estas células fusionadas se sometieron a selección en medio HAT como previamente descrito (Galfre y Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46, 1981). Se recuperó un panel de hibridomas que segregan todos anticuerpos IgG2 humanos específicos para c-Met. Cuatro hibridomas se seleccionaron para estudios adicionales y se designaron 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3. Los hibridomas se depositaron bajo los términos del Tratado de Budapest en la colección de cultivos American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 el 4 de marzo de 2003. Los hibridomas recibieron los siguientes números de acceso:

Hibridoma 13.3.2 (LN 15883)	PTA-5026
Hibridoma 9.1.2 (LN 15884)	PTA-5027
Hibridoma 8.70.2 (LN 15885)	PTA-5028
Hibridoma 6.90.3 (LN 15886)	PTA-5029

EJEMPLO II

Secuencias de anticuerpos anti-c-Met preparados de acuerdo con la invención

[0233] Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos de acuerdo con la invención, se clonaron ácidos nucleicos que codifican fragmentos de la cadena pesada y liviana de hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales anti-c-Met 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3. La clonación y secuenciación se realizaron como sigue:

[0234] Usando un equipo Fast-Track (Invitrogen), se aisló mRNA Poly(A)⁺ a partir de aproximadamente 2 x 10⁵ células de hibridoma derivadas de ratones XenoMouse™ inmunizados con c-Met humano. A partir del mRNA obtenido se sintetizó cDNA usando cebadores aleatorios. El cDNA sintetizado con cebadores aleatorios se amplificó usando cebadores del dominio variable específicos para la familia de V_H o V_K humanos (Marks et al., "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes." *Eur. J. Immunol.* 21:985-991 (1991)) o usando un cebador para V_H humano universal [MG-30, 5'-CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG-3'] (SEQ ID NO: 25)], en conjunción con cebadores específicos para la región constante C_γ2 humana, MG-40d [5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3' (SEQ ID NO: 26)] o una región constante C_κ [hkP2; según lo descrito previamente en Green et al., 1994]. Se obtuvieron moléculas de ácido

nucleico que codifican transcriptos de la cadena pesada y liviana kappa humana de los hibridomas que producen anti-c-Met mediante la secuenciación directa de productos PCR generados a partir de RNA poly(A⁺) usando los cebadores arriba descritos. Los productos PCR se clonaron en pCRII (Invitrogen) usando un equipo de clonación TA (Invitrogen) y se secuenciaron ambas hebras usando equipos de secuenciación "Dye-Terminator Prism" (Applied Biosystems Inc) y una máquina de secuenciación ABI 377 (Applied Biosystems Inc). Todas las secuencias se analizaron mediante alineación con las secuencias del directorio de secuencias "V BASE sequence directory" (Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) usando programas de software MacVector y Geneworks.

[0235] Los anticuerpos monoclonales 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3 se sometieron a clonación y secuenciación de DNA de longitud completa. Para tal secuenciación, se aisló RNA a partir de aproximadamente 2 x 10⁶ células de hibridoma usando el equipo de aislación de RNA QIAGEN RNeasy (QIAGEN). El mRNA se sometió a transcripción inversa usando hexámeros aleatorios (Roche Applied Science) y el equipo de transcriptasa inversa con Rnasa H SuperScript II (Invitrogen). Se usó el software V Base para diseñar cebadores de amplificación adelantados que incluyen sitios de restricción, la secuencia óptima Kozak, el sitio de iniciación ATG y parte de la secuencia señal de la cadena pesada. La Tabla 2 enumera los cebadores de amplificación adelantados usados para obtener los clones de anticuerpo.

TABLA 2

Clon	Cebador adelantado de cadena pesada	SEQ ID NO:
13.3.2	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGACTGGAC CTGGAGCATC	31
9.1.2	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGAAACACCTG TGGTTCTTC	32
8.70.2	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGAAGCACCT GTGGTTCTTC	33
8.90.3	TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGAGTTGGG GCTGTGCTGG	34

Se usó el mismo método para diseñar un cebador que incluye las secuencias de codificación 3', el codón de parada de la región constante IgG2 [5'-TTCTCTGATCAGAATTCCTATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3' (SEQ ID NO:27)] y los sitios de restricción.

[0236] Se usó el mismo método para diseñar un cebador alrededor del sitio de iniciación ATG de la cadena kappa [5'-TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCT-3'(SEQ ID NO:28)] se agregó una secuencia óptima Kozak (CCGCCACC) en 5' del sitio de iniciación ATG. Este cebador se usó para clonar mediante PCR las cadenas livianas de los clones de anticuerpo 13.3.2; 8.70.2 y 8.90.3. Se usó un segundo cebador adelantado [5'-TATCTAAGCTTCTAGACGCCACCATGGAAACCCCAGCGCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:29)] para clonar la cadena liviana del clon 9.1.2. También se usó el mismo método para diseñar un cebador alrededor del codón de parada de la región constante kappa [5'-TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3' (SEQ ID NO:30)]. Para amplificar los cDNAs, con los pares de cebadores se usó la DNA polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen). El producto PCR se clonó en pCR-Blunt-II-TOPO (Invitrogen) para obtener la secuencia de tres a cinco clones para cada gen de cadena kappa usando técnicas estándar (por ejemplo, desplazamiento del cebador (primer walking)), empleando equipos de secuenciación "dye-terminator" y un analizador de DNA ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems Inc). El producto PCR se clonó en un vector de expresión mamífero y los clones se secuenciaron para confirmar mutaciones somáticas. Para cada clon se verificó la secuencia en ambas hebras en al menos tres reacciones.

Análisis de genes utilizados

[0237] A partir de la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácido prevista de los anticuerpos, se identificaron los genes usados para cada cadena del anticuerpo. La Tabla 3 indica los genes utilizados de clones de hibridoma seleccionados para los anticuerpos de acuerdo con la invención:

Tabla 3 Utilización de genes para la cadena pesada y liviana

Clon	Línea germinal de la cadena pesada				Línea germinal de la cadena liviana kappa		
	SEQ ID NO:	V _H	D _H	J _H	SEQ ID NO:	V _k	J _k
13.3.2	21	1-18	D2-15	J _H 4b	17	L5V _k 1	4
9.1.2	22	4-31	D2-2, D7-27	J _H 6b	18	A27V _k 3	2
8.70.2	23	4-39	D2-2	J _H 4b	19	L5V _k 1	3
8.90.3	24	3-48	D4-17	J _H 4b	20	L5V _k 1	1

[0238] Se llevó a cabo mutagénesis de residuos específicos de las cadenas pesadas y livianas, diseñando cebadores y usando el equipo para mutagénesis dirigida a un sitio QuickChange de Stratagene, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación automática, y los insertos mutagenizados se subclonaron en vectores de expresión. Estos vectores de expresión se transfectaron en células NSO (ECACC # 85110503) y HEK-293T (American Type Culture Collection) para expresar anticuerpos recombinantes de la invención.

EJEMPLO III

Anticuerpos anti-c-Met humanos bloquean la ligadura de HGF a c-Met

[0239] Se condujeron ensayos *in vitro* para medir la ligadura de HGF a c-Met en presencia de anticuerpos anti-c-Met para determinar si los anticuerpos anti-c-Met eran capaces para inhibir la ligadura de HGF a c-Met y el grado de esta inhibición.

[0240] Las cavidades de una placa de cultivo de tejidos de 96 cavidades se recubrieron durante la noche a temperatura ambiente con 100 µl de una solución de 5 µg/ml que comprende ECD/Fc de c-Met (R&D Systems #358 MT) en solución fisiológica bufferada con fosfato (PBS). Las placas se guardaron a 4°C hasta su utilización para los experimentos. Las cavidades se lavaron cuatro veces con solución fisiológica bufferada con Tris (pH = 8,0) que contiene 0,05% de TWEEN-20 (TBS-T). Luego, para bloquear sitios no específicos, se agregaron durante 60 minutos (min) a temperatura ambiente 200 µl/cavidad de buffer de bloqueo (albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en TBS-T). Las cavidades se lavaron 4 veces con 300 µl/cavidad de TBS-T. Luego, se agregaron a cada cavidad 100 µl de Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de FBS que contiene anticuerpos anti-c-Met de sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos purificados en o PBS o acetato de sodio 20 mM (pH = 5,5), NaCl 140 mM en varias concentraciones (por ejemplo, 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03 y 0,01 µg/ml, en base a las concentraciones de IgG2 humana en los sobrenadantes). A las cavidades de control del experimento no se agregaron anticuerpos anti-c-Met. Las muestras se mezclaron durante 4 horas (hrs) a temperatura ambiente. Luego, se agregaron a cada cavidad 10 µl de 100 ng/ml de HGF en DMEM libre de suero. Las muestras se mezclaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las cavidades se lavaron 4 veces con 300 µl/cavidad/lavado de TBS-T. Luego, se agregaron 100 µl de una dilución 1:2000 de 100 µg/ml de anticuerpo anti-HGF biotinilado en buffer de bloqueo. Las soluciones se incubaron en las cavidades durante 30 min a temperatura ambiente. Las cavidades se lavaron 5 veces con 300 µl/cavidad de TBS-T. Luego, se agregaron 100 µl/cavidad de 1,25 mg/ml de streptavidina - peroxidasa de rábano picante (HRP) en una dilución 1:5000 de buffer de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 5 veces con TBS-T, con aproximadamente 300 µl/cavidad/lavado. Luego, se agregaron 100 µl/cavidad del substrato de 3, 3', 5, 5' -tetrametilbenzidina (TMB) peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories) y se desarrolló durante 1-2 min a temperatura ambiente. Para parar la reacción, se agregaron 100 µl/cavidad de solución de parada de TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, #50-85-04). Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 450 nanómetros (nm) con un lector para placas de 96 cavidades sin substracción de valor de fondo.

[0241] Estos experimentos demostraron que los anticuerpos anti-c-Met inhibieron la ligadura de HGF en comparación con muestras de control. El ensayo de ligadura del ligando (Tabla 4) muestra la IC₅₀ para la inhibición de la ligadura del ligando para los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3.

Tabla 4

Anticuerpo	9.1.2	8.90.3	13.3.2	8.70.2	13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T
Ensayo					
Ensayo de ligadura del ligando [IC ₅₀ , µg/ml]	0,093	0,110	0,090	0,115	0,127
Ensayo de pTir celular [IC ₅₀ , µg/ml]	0,033	0,086	0,033	0,143	0,032
Niveles de Met celular [% de pérdida a 1,0 µg/ml]	46,9	17,5	23,8; 21,9	11,0	28,5
Cultivo en agar blando [IC ₅₀ , µg/ml]	5,5	10,5	8,5	25	ND
Antagonismo de morfogénesis tubular [% de inhibición a 1 µg/ml]	84	61	ND	25	ND
Actividad agonista [estimulación máxima] (x)	6,5	2,3	2,7	2,5	2,5
Agonismo de morfogénesis tubular [estimulación a 50µg/ml] (x)	2,2	2,5	ND	8,2	ND

ND: No efectuado

EJEMPLO IV

Inhibición de la fosforilación de c-Met mediante anticuerpos anti-c-Met

[0242] Se usaron anticuerpos anti-c-Met de la invención para medir la inhibición de la fosforilación de c-Met en células después de la estimulación con HGF.

[0243] En placas de 96 cavidades con fondo U para cultivo de tejido (Falcon, #3077), se extendieron células A549 a una densidad de 1×10^5 células por cavidad en un volumen total de 200 µl/cavidad de DMEM suplementado con 10% de FBS. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂ durante 24 horas. El medio se aspiró suavemente de cada cavidad de las placas. Los sobrenadantes de hibridoma a ser ensayados se microcentrifugaron a 14.000 rpm durante 5-10 min y las células se trataron con 200 µl/cavidad del sobrenadante de hibridoma o una solución del mismo, o con anticuerpos purificados en PBS o acetato de sodio 20 mM (pH = 5,5), NaCl 140 mM. A las cavidades de control negativo se agregó sobrenadante de un hibridoma irrelevante. Las células se incubaron a 37°C durante un periodo de tiempo corto (por ejemplo, 4 horas) o durante un periodo de tiempo mayor (por ejemplo, 24 horas) y luego se estimularon mediante el agregado de 22 µl/cavidad de una solución de 2 µg/ml de HGF en medio DMEM libre de suero o buffer de Hank para dar una concentración final de 44 ng/cavidad de HGF. Las placas se incubaron durante 15 min a 37°C, luego el medio se aspiró suavemente de las cavidades de las placas. Las células se lavaron con PBS frío que contiene Na₃VO₄ 1 mM y la solución se aspiró suavemente de las placas. Las células se sometieron a lisis con 50 µl de buffer de lisis (buffer de Lisis NP-40: NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH = 8,0, NP-40 al 1%, EDTA 10 mM, glicerol al 10%, con Na₃VO₄ 1 mM recientemente agregado e inhibidores de proteasa (tableta Complete, Roche #1-873-580, usada de acuerdo a las directivas del fabricante). Las placas se agitaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, las placas pudieron almacenarse a -20°C hasta su uso para ELISA.

[0244] Se usó un ensayo ELISA para determinar niveles de fosforilación de c-Met. Para la preparación de una placa ELISA, placas recubiertas con antisuero de cabra anti-conejo Reacti-Bind se lavaron tres veces con buffer de lavado (TBS-T Sigma #T-9039). Luego, se agregaron 100 µl de anticuerpo de captura policlonal anti-c-Met (Santa Cruz, sc-10) en buffer de dilución (SuperBlock al 10% de Pierce en TBS-T) (concentración final de 5 µg/ml). Las placas se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 2 horas y luego se lavaron cinco veces con TBS-T. Sitios de ligadura no específicos se bloquearon con 200 µl/cavidad de Superblock en TBS-T durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación.

Inmediatamente antes del uso, se aspiró la solución de bloqueo de las placas Reacti-Bind.

[0245] Se prepararon lisados celulares agregando 100 µl de dilución de buffer que contiene

Na_3VO_4 1 mM y pipeteando los lisados hacia arriba y abajo y raspando las cavidades con las puntas. Luego, a las placas Reacti-Bind se agregaron 100 μl /cavidad de lisados celulares diluidos en la proporción 1:3 y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min con agitación. Las placas se lavaron cinco veces con TBS-T. Luego, se agregaron 100 μl /cavidad de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo antifosfotirosina PY20-HRP (Transduction Labs, #P11625) en albúmina de suero bovino – TBS-T al 3% que contiene Na_3VO_4 1 mM. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron cinco veces con TBS-T, removiendo los lavados mediante aspiración. Las placas se secaron sobre toallas de papel para eliminar un exceso de líquido. Luego, se agregaron 100 μl /cavidad de solución de sustrato TMB peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, #50-76-04) y se desarrolló agitando suavemente durante 4-5 min a temperatura ambiente. Las reacciones se pararon con 100 μl /cavidad de solución de parada TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories, #50-85-04). Las placas se leyeron a una longitud de onda de 450 nm usando un lector para placa de 96 cavidades.

[0246] Estos experimentos demuestran que los anticuerpos anti-c-Met inhibieron la fosforilación de c-Met en células estimuladas con HGF en comparación con células de control. El ensayo de fosfo-tirosina celular (Tabla 4) muestra la IC_{50} para la inhibición de la fosforilación de c-Met celular para anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3 (Ensayo pTir celular).

EJEMPLO V

Disminución de c-Met con anticuerpos anti-c-Met en células después de la estimulación con HGF

[0247] Se condujo un ensayo para medir el efecto de inhibición de anticuerpos anti-c-Met sobre los niveles de expresión de c-Met en células estimuladas con HGF.

[0248] Se prepararon lisados celulares A549 según lo descrito en el Ejemplo IV. Para determinar los niveles de c-Met se realizó un ensayo ELISA. El ensayo ELISA se realizó esencialmente como descrito en el Ejemplo IV con los cambios siguientes: en vez de usar un anticuerpo anti-fosfo-tirosina, a cada cavidad se agregaron 100 μl de anticuerpo UBI 05-237 (ascitos) (Anti-Met, ECD, clon DO24 Upstate Biotechnology, #21601) diluidos a 1:1000 en BSA al 3% - TBS-T (con Na_3VO_4 1 mM). Las etapas de incubación y lavado fueron las mismas del Ejemplo IV. Luego, se agregaron 100 μl /cavidad de 0,8 mg/ml de IgG de cabra anti-ratón conjugada con (H+L)-HRP (Jackson ImmunoResearch Labs, #115-035-146 reconstituída en 750 μl de agua + 750 μl de glicerol), diluidos a 1:5000 en BSA - TBS - T al 3%. Las placas se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con agitación. Las etapas de lavado y detección fueron las mismas del Ejemplo IV.

[0249] Estos experimentos demuestran que los niveles de c-Met disminuyen algo en células después de la estimulación con HGF en presencia de anticuerpos anti-c-Met, en comparación con células de control estimuladas con HGF (Disminución de los niveles de Met celular, vea niveles de Met celular en la Tabla 4).

EJEMPLO VI

Efectos anti-proliferativos de anticuerpos anti-c-Met sobre el cultivo de células en agar blando

[0250] Se realizaron ensayos de cultivo en agar blando para medir los efectos anti-proliferativos de anticuerpos anti-c-Met.

[0251] Células tumorales S114, células NIH-3T3 preparadas mediante ingeniería genética para expresar HGF humano y c-Met humano, se mantuvieron en DMEM suplementado con suero de ternero al 10%, 1000 unidades/ml de penicilina, 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycin y L-glutamina 2 mM (medio de cultivo). Los cultivos celulares se tripsinizaron y se lavaron en DMEM libre de suero y la concentración se ajustó a 50.000 células/ml. Los anticuerpos purificados en PBS o acetato de sodio 20 mM (pH = 5,5), NaCl 140 mM se prepararon en tubos de 15 ml a concentraciones 10 veces mayores que las varias concentraciones finales. En cajas de Petri de 35 mm se prepararon dos capas de 0,5% (fondo) y 0,35% (parte superior) de agar diluido en medios de cultivo celular. La capa de fondo consistió de un medio de crecimiento que contiene 0,5% de agar en un volumen total de 2 ml. La capa superior consistió de un medio de crecimiento que contiene 0,35% de agar, 5.000 células S114, y la preparación de anticuerpos en una concentración final comprendida entre 0,625 – 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un volumen total de 1 ml, que se extendió sobre la capa de agar del fondo. Esta solución se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó durante la noche a 37°C en una atmósfera de 10% de CO_2 . 24 horas después, se agregó una preparación de anticuerpos adecuada con

0,5 ml de medio para mantenerla húmeda y las cajas de Petri se incubaron a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂ durante unos 7-10 días adicionales. Los medios se separaron y se reemplazaron con 0,5 ml de 1 mg/ml de violeta p-yodonitrotetrazolio en PBS durante 48 horas. Se contó el número de colonias con ROBOT (Ludel Electronics, Ltd.) usando software ETC3000 (Engineering Technology Center).

[0252] Estos experimentos demuestran que los anticuerpos anti-c-Met inhibieron la proliferación de células cultivadas en agar blando. Los datos de cultivo en agar blando (Tabla 4) muestran la IC₅₀ para la inhibición de la proliferación de las células en agar blando para los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3.

EJEMPLO VII

Inhibición de cambios morfológicos celulares dependientes de c-Met en células con anticuerpos anti-c-Met

[0253] Las células HepG2, que expresan c-Met, forman estructuras tubulares al ser cultivadas en MATRIGEL™ (Becton-Dickinson), un material de matriz extracelular que contiene componentes de la membrana basal, en presencia de HGF. Se realizaron ensayos usando células HepG2 para medir la formación de tubos (morfogénesis tubular) y su inhibición al cultivar células en presencia de HGF y tratarlas con anticuerpos anti-c-Met.

[0254] Dos ml de una solución de medio MATRIGEL™ (MATRIGEL™ (Becton-Dickinson) diluidos en Opti-MEM I (Invitrogen), FBS inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina/streptomycin 1 X)) se extendieron en placas para cultivo de tejidos de 35 milímetros (mm). Una vez que la solución del medio MATRIGEL™ se solidificó, se agregó 1 ml de medio suplementado con suero al 10% y 40.000 células HepG2. Luego, se agregaron al medio HGF (concentración final 50 ng/ml) y/o anticuerpo c-Met (concentración final de 1,5 o 10 µg/ml). Las células se cultivaron durante 4 días a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂. Al final de los 4 días, se separó el medio superior y se agregaron 0,5 ml de 1 mg/ml de violeta p-yodonitrotetrazolio en PBS durante 48 horas. Las placas de 35 mm coloreadas se fotografiaron y se analizaron usando ImagePro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

[0255] Estos experimentos demuestran que los anticuerpos anti-c-Met inhiben cambios morfológicos tubulares dependientes de c-Met cuando se cultivan células que expresan c-Met en presencia de HGF, en comparación con muestras de control. La Tabla 4 muestra la inhibición de morfogénesis tubular para los anticuerpos 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3 en una concentración de 1 µg/ml.

EJEMPLO VIII

Determinación de constantes de afinidad (K_D) de anticuerpos monoclonales anti-c-Met mediante BIACORE™

[0256] Se determinó la afinidad de ligadura de anticuerpos purificados mediante resonancia en la superficie de un sensor recubierto con la muestra (surface plasmon resonance = resonancia en la superficie plasmática) usando el instrumento BIACORE™ 3000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.), siguiendo los protocolos del fabricante.

[0257] Los experimentos se realizaron en un instrumento BIACORE™ 3000 a 25°C en solución fisiológica bufferada con fosfato de Dulbecco que contiene 0,0005% de Tween-20. Las concentraciones de proteínas se obtuvieron a partir de experimentos de velocidad de sedimentación o midiendo la longitud de onda de la muestra a 280 nm, usando coeficientes de extinción teóricos derivados de secuencias de aminoácidos. Para experimentos que miden la ligadura del anticuerpo a antígenos inmovilizados, se inmovilizaron 220 RU (unidades de resonancia) de ECD-Fc de c-Met (humano o de cynomologus) sobre un chip B1 (BIACORE™) mediante procedimientos estándar de copulación directa de aminas. Se prepararon muestras de anticuerpos 13.3.2; 8.70.2 y 8.90.3 con una concentración de 0,69 µM y del anticuerpo 9.1.2 con una concentración de 0,23 µM. Estas muestras se diluyeron mediante una serie de 3 diluciones a 8,5 nM ó 2,8 nM para obtener concentraciones en la gama aproximada de 1:100. Para cada concentración, se inyectaron muestras por duplicado con una velocidad de flujo de 5 µl/min durante 4 min. Se monitoreó la disociación durante 2000 segundos. Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de ligadura simple 1:1 usando el software BIACORE™ Biavel. Además, para determinar la k_{off} independientemente de cualquier error potencial en la concentración activa o el modelo de ajuste, los datos de disociación se ajustaron globalmente, e independientemente de los datos de asociación, a un modelo de disociación simple. Este método se usó en todos los casos para obtener k_{off} y se encontró que los datos se

compararon bien con aquellos obtenidos a partir del ajuste global de los datos de asociación y disociación.

[0258] La Tabla 5 exhibe datos de K_D y k_{off} generados con anticuerpos 13.3.2; 8.70.2; 8.90.3 y 9.1.2.

Tabla 5

	13.3.2	9.1.2	8.70.2	8.90.3	13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T
K_D (M) (humano)	$2,2 \times 10^{-10}$	$8,2 \times 10^{-10}$	$3,3 \times 10^{-10}$	$5,3 \times 10^{-10}$	$2,0 \times 10^{-10}$
k_{off} (1/s) (humano)	$1,5 \times 10^{-4}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-4}$
K_D (M) (cynomologus)	$6,0 \times 10^{-10}$	$1,1 \times 10^{-9}$	$3,2 \times 10^{-10}$	$1,22 \times 10^{-9}$	$6,1 \times 10^{-10}$
k_{off} (1/s) (cynomologus)	$2,9 \times 10^{-4}$	$9,8 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$

EJEMPLO IX

Determinación de constantes de afinidad (K_D) de anticuerpos monoclonales anti-c-Met con citometría de flujo

[0259] Se determinó la afinidad de ligadura de anticuerpos purificados dirigidos a c-Met expresado en la superficie de células de carcinoma de pulmón A549 humanas y células de riñón de cynomologus mediante citometría de flujo usando el citómetro de flujo BD™ Biosciences LSR según los protocolos del fabricante.

[0260] Células cultivadas en cultivo se lavaron con PBS, se incubaron brevemente en presencia de tripsina-EDTA al 0,25% (Invitrogen) y se recolectaron. Las células recolectadas se lavaron en buffer de lavado PBS que contiene 0,025% de azida sódica y 2% de suero inactivado por calor, se pelletizaron y se resuspendieron 5×10^5 células en 500 μ l del mismo buffer. Para cada anticuerpo se determinó independientemente el tiempo necesario para llegar al equilibrio de ligadura a temperatura ambiente, incubando concentraciones de subsaturación de cada anticuerpo con células, tiempo que resultó estar comprendido entre seis y ocho horas. Luego, se determinó para cada anticuerpo la ligadura media (half-maximal binding) (K_D) a partir del promedio geométrico de las intensidades de fluorescencia de concentraciones de anticuerpos entre 0,1 ng/ml y 3 μ g/ml. Cada anticuerpo se incubó con células separadas durante 6 a 8 horas a temperatura ambiente en dependencia del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Las células se lavaron, se resuspendieron y se incubaron durante 45 minutos sobre hielo en 500 μ l de una dilución 1:500 de IgG anti-humana de ratón biotinilada (Jackson Labs) en buffer de lavado PBS. Luego, las células se lavaron, se resuspendieron y se incubaron durante 15 min sobre hielo y con protección de la luz con 10 μ g/ml de conjugado de streptavidina R-ficoeritrina (Caltag) en 200 μ l de buffer de lavado PBS. Las células se lavaron y se detectaron las señales con un citómetro de flujo BD Biosciences LSR de acuerdo con los protocolos del fabricante.

[0261] Estos experimentos demuestran que cada uno de los anticuerpos anti-c-Met descritos se liga a c-Met humano y de cynomologus expresado sobre la superficie celular con afinidades comparables (vea Tabla 6).

Tabla 6

	13.3.2	9.1.2	8.70.2	8.90.3	13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T
K_D (M) (humano)	$3,93 \times 10^{-11}$	$1,69 \times 10^{-10}$	$4,07 \times 10^{-11}$	$2,60 \times 10^{-11}$	$5,60 \times 10^{-11}$
k_{off} (1/s) (humano)	ND	ND	ND	ND	ND
K_D (M) (cynomologus)	$4,86 \times 10^{-11}$	$1,68 \times 10^{-10}$	$5,53 \times 10^{-11}$	$3,93 \times 10^{-10}$	$7,33 \times 10^{-11}$
k_{off} (1/s) (cynomologus)	ND	ND	ND	ND	ND

EJEMPLO X

Inhibición del crecimiento de tumores *in vivo* con anticuerpos anti-c-Met

[0262] Se realizaron ensayos *in vivo* para medir la inhibición del crecimiento de tumores sólidos después del tratamiento con anticuerpos anti-c-Met.

[0263] S114, U87 (células de glioblastoma humano), GTL-16 (células de tumor gástrico humano) y A549 (células epiteliales de carcinoma de pulmón humano) se mantuvieron en DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS inactivado por calor al 10% (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen) y penicilina (1.000 unidades/ml)-streptomicina (1.000 µg/ml) al 1% [volumen/volumen] (Invitrogen) en un incubador para cultivo de tejido a 37°C y atmósfera de 10% de CO₂. Con el fin de inocular células tumorales en ratones atímicos (nu/nu), se usó tripsina al 0,25% en EDTA 1 mM para separar células tumorales de sus frascos de cultivo. Las células se contaron y se diluyeron con solución fisiológica bufferada de Hank. Las células tumorales se inocularon subcutáneamente en cada sujeto animal, usando 1,0-5,0 x 10⁶ células tumorales en un volumen final de 0,2 ml de solución fisiológica bufferada de Hank. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño de 100-200 mm³ (día 5 después de la inoculación para tumores S114 y U87, aproximadamente 15-20 días para tumores A549 y aproximadamente 6 días para tumores GTL-16), se inyectaron 200 µl de solución de anticuerpo. Los anticuerpos se almacenaron en acetato de sodio 20 mM, pH 5,5, cloruro de sodio 140 mM y se diluyeron con solución fisiológica bufferada con fosfato estéril a la concentración de anticuerpo deseada. Se inyectaron o 100 µg ó 200 µg de anticuerpo en la cavidad intraperitoneal (IP) de cada sujeto animal experimental. A los animales de control se administraron soluciones del vehículo. Cada dos o tres días después de la administración IP de la solución de anticuerpos se midieron con calibre los tamaños del tumor en los ratones, hasta la terminación de los experimentos.

[0264] Estos experimentos demuestran que todos los anticuerpos anti-c-Met ensayados inhiben el crecimiento de tumores sólidos *in vivo* en comparación con animales de control. Además, usando varias concentraciones de anticuerpos, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral obtenido con los anticuerpos 13.3.2; 9.1.2; 8.70.2,8.90.3 y 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T (Vea Tabla 7). En el experimento resumido en la Tabla 7, todos los anticuerpos se administraron en una sola dosis intraperitoneal, excepto para el experimento del día 41 con animales que tienen tumores A549, que implicó cuatro dosis de anticuerpo, y el experimento del día 21 con animales que tienen tumores GTL-16, que implicó dos dosis de anticuerpo. Las dosis usadas fueron 200 µg para los tumores S114, 100 µg para los tumores U87, 200 µg para los tumores A549 y 200 µg para los tumores GTL-16. Los valores entre paréntesis corresponden a la dosis de 200 µg de 13.3.2 en el modelo U87. ND, significa no efectuado en el experimento mostrado.

Tabla 7

Tipo de tumor: Anticuerpo:	% de inhibición (volumen del tumor)			
	S114 (día 12)	U87 (día 17)	A549 (día 41)	GTL-16 (día 21)
9.1.2	77,2	61,4	40,6	ND
13.3.2	99,1	74,2 (83,1)	45,9	ND
8.70.2	83,2	ND	ND	ND
8.90.3	94,8	49,0	ND	ND
13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T	ND	ND	ND	55,7

EJEMPLO XI

Actividad agonista con anticuerpos anti-c-Met

Activación de c-Met mediante anticuerpos anti-c-Met en ausencia de estimulación con HGF

[0265] Se midió la activación de c-Met en células incubadas con anticuerpos anti-c-Met en ausencia de HGF para determinar la actividad agonista de anticuerpos c-Met de la invención. Para determinar si c-Met fue activado en las células, se usó un ensayo ELISA para medir la fosforilación de c-Met. Se agregaron entre 0,01-10 µg/ml de anticuerpo a células A549 extendidas sobre placas según los descrito en el Ejemplo IV, excepto que las células no se estimularon con HGF. Los lisados celulares A549 se prepararon según lo descrito en el



Ejemplo IV. Se realizó un ensayo ELISA según lo descrito en el Ejemplo IV.

[0266] Estos experimentos demuestran que tres de los anticuerpos ensayados muestran una actividad débil, aproximadamente de 2-3 veces de c-Met, en ausencia de HGF, en comparación con células no incubadas con anticuerpo anti-c-Met o HGF (Vea Tabla 4); sin embargo, el anticuerpo 9.1.2 mostró una activación mayor.

Cambios morfológicos celulares dependientes de c-Met en células tratadas con anticuerpos anti-c-Met en ausencia de HGF

[0267] Se realizaron ensayos de morfogénesis tubular para medir la actividad agonista del anticuerpo anti-c-Met. Los ensayos se realizaron según lo descrito en el Ejemplo VII, excepto que las células se cultivan en ausencia de HGF y se tratan con anticuerpos anti-c-Met (1, 10 y 50 µg/ml). La cantidad de morfogénesis tubular se determinó según lo descrito en el Ejemplo VII. El ensayo muestra que tres anticuerpos anti-c-Met ensayados tienen una actividad agonista débil a moderada. La Tabla 4 muestra la cantidad de actividad agonista medida mediante morfogénesis tubular para los anticuerpos 9.1.2; 8.70.2 y 8.90.3.

EJEMPLO XII

Inhibición de fosforilación de c-Met e inducción de la degradación de c-Met mediante anticuerpos anti-c-Met *in vivo*

[0268] Determinamos los efectos de los anticuerpos anti-c-Met sobre el estado de fosforilación y los niveles proteicos de c-Met *in vivo*. Células tumorales humanas se introdujeron en ratones atímicos, lo que resultó en la formación de tumores xeno-injertados (xenograft) de acuerdo con los métodos de V.A. Pollack et al., ("Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: Dynamics of receptor inhibition in situ and antitumor effects in athymic mice," J. Pharmacol. Exp. Ther. 291:739-748 (1999)).

[0269] Células de glioblastoma humano U87 (5×10^6) se inyectaron subcutáneamente en ratones atímicos (*nu/nu*) de 3-4 semanas de edad, y subsecuentemente se inyectó intraperitonealmente un anticuerpo anti-c-Met de la presente invención en ratones con tumores establecidos (aproximadamente 300 mm³). Los tumores se extrajeron a distintas horas después de la inyección del anticuerpo (1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 168 y 216 horas) y se prepararon homogeneizados (1 ml buffer de lisis / 100 mg de peso tumoral) para evaluar la fosforilación y los niveles proteicos de c-Met. Lisados que contienen dos miligramos de proteína se inmunoprecipitaron durante 2 horas a 4°C con 25 µl de perlas de agarosa sc-10 (Santa Cruz) específicas para c-Met. Las perlas se lavaron, y la proteína ligada se eluyó mediante ebullición durante 5 minutos en buffer de muestra de Laemmli y se separó mediante SDS-PAGE usando geles NovexTM con gradiente de 4-12%. Luego, las proteínas inmunocapturadas se transfirieron por puntuación eléctrica (were electroblotted) a membranas PVDF de 0,45 µM (Invitrogen). Las membranas se bloquearon en BSA al 3% en PBS-T (0,5% de Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente y se ensayaron con el anticuerpo específico para anti-fosfotirosina PY100 (Cell Signaling Technology), seguido por IgG/HRP anti-ratón para detectar fosfoMet o por sc-10-HRP (Invitrogen) para detectar proteína Met total. La señal se desarrolló con reactivo ECL (Amersham Biosciences) y se detectó mediante la exposición a película radiográfica (Kodak).

[0270] La Figura 5 muestra los niveles en suero de anticuerpos 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T, los niveles de fosfo-c-Met y los niveles de proteína c-Met total en función del tiempo. El experimento demuestra que la disminución de los niveles de fosfo-c-Met y proteínas c-Met total está relacionada con el anticuerpo y que el grado de inhibición de c-Met es proporcional a la concentración del anticuerpo en suero.

EJEMPLO XIII

Estudios de elaboración de mapas de epítopes

[0271] Se realizaron experimentos de competición usando un formato ELISA para definir clases de epítopes reconocidas por los anticuerpos de la invención.

[0272] Las cavidades de una placa de 96 cavidades se recubrieron con 50 µl/cavidad de una solución patrón de 0,5 µg/ml de ECD-Fc de Met humano en buffer NaHCO₃ 0,1 M, pH 9,6, durante la noche a 4°C o durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron en PBS, 0,05% de Tween-20 (PBS-T) y se bloquearon con 200 µl/cavidad de buffer de bloqueo (PBS que contiene 0,5% de BSA, 0,1% de Tween-20 y 0,01% de timerosal) a temperatura ambiente

durante una hora. Después del lavado, se agregaron 100 μ l de anticuerpo en buffer de bloqueo a varias concentraciones (15, 5, 1,7 y 0,6 μ g/ml de anticuerpo/ml) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Luego, se agregaron 100 μ l de una solución de 83 pg/ml de anticuerpo biotinilado (~ 4 biotinas/molécula) en buffer de bloqueo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se agregó streptavidina-HRP y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. La ligadura se indicó mediante el desarrollo de color después del agregado de 100 μ l/cavidad de solución de TMB peroxidasa no diluída (BioFX Labs). El desarrollo del color se terminó con 100 μ l/cavidad de solución de parada no diluída (BioFX Labs) y se cuantificó mediante la medición a OD_{450nm}.

[0273] Estos experimentos demuestran que los anticuerpos monoclonales 13.3.2, 13.3.2L-A91T, H-E42K, S97T, 8.70.2 y 8.90.3 se ligan a un epítoto común (bin 1) sobre el dominio extracelular de c-Met y que el anticuerpo monoclonal 9.1.2 se liga a un epítoto distinto (bin 2).

[0274] Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en ésta por referencia, aunque no hubiese sido indicado específicamente para cada publicación o solicitud de patente individual. A pesar de que la invención precedente se describió a modo de ilustración con algunos detalles y se dieron ejemplos con el propósito de claridad de entendimiento, será fácilmente aparente para los entendidos en el arte que en base a las enseñanzas de esta invención pueden efectuarse ciertos cambios y modificaciones a la misma, sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABGENIX, INC.
PFIZER PRODUCTS INC.
MICHAUD, NEIL R., et al.

<120> ANTICUERPOS DIRIGIDOS A c-MET

<130> ABX-PF5 PCT

<140> No asignado todavía
<141> Simultáneamente con ésta

<150> US 60/492,432
<151> 2003-08-04

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1
<211> 1389
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
atggactgga cctggagcat cctttcttg gtggcagcas caacagggtgc ccactcccag 60
gttcagctgg tgcagtctgg agctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggctccc 120
tgcraggctt ctggttacac ctttaccagc tatggttca gctgggtgcg acaggcccct 180
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcgcttcca atggtaacac atactatgca 240
cagaagctcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgagcwc agcctacatg 300
gagctgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt actgtgcgag agtctacgcc 360
gactacgtg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctctcagc ctccaccaag 420
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgcgtg gaactcaggc 540
gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtctac agtctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac 660
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 720
gagtcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttct cttccccca 780
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 840
gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttaacagca cgttcctgt ggtcagcgtc 960
ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac 1020
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gcccagagaa 1080
ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260
ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
ggtaaatga 1389

<210> 2

<211> 462
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> Glu or Lys

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (42)
 <223> Ser or Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (97)
 <223> Ala or Pro

<400> 2
 Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Xaa Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Xaa Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Gly Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Xaa Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Ala Asp Tyr Ala Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
225 230 235 240

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 3

<211> 711

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgggt cccaggttcc 60

agatgcgaca tccagatgac ccagtcacca tctccgtgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcacatca ctgtcgggc gagtcagggt attaacacct ggtagcctg gtatcagcag 180
 aaaccagga aagcccctaa actcctgac tatgtgcat ccagttgaa aagtggggc 240
 ccatcaagg ttagcgccag tggatcggg rcagattca ctccacat cagcagcctg 300
 cagcctgaag atttgcaac ttactattgt caacaggcta acagttccc tctactttc 360
 ggccgaggga ccaagggtga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt ctcatcttc 420
 ccgccatctg atgagcagti gaaatcggga actgcctctg ttgtgtcct gctgaataac 480
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
 ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagtct acgcctgca agtcacccat 660
 cagggcctga gctcggcgt cacaagagc ttcaacagg gagagtgtta g 711

<210> 4

<211> 236

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (91)

<223> Ala ó Thr

<400> 4

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Gly Ile Asn Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val

65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Xaa Asp Phe Thr Leu Thr

85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile

115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

180	185	190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
195	200	205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
210	215	220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235

<210> 5
 <211> 1443
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atgaaacacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 gtgcagctgc aggagtggg cccaggactg gtgaagcctt cacagaccct gtcctcacc 120
 tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt ggtggttact actggagctg gatccgccag 180
 caccagggga agggcctgga gtggattggg tacatctatt acagtgggag cacctactac 240
 aaccgcgtccc tcaagagtcg agttaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc 300
 ctgaagctga gctctgtgac tgcccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 360
 cccctaggat attgtagtag taccagctgc ccggttaactg gggaatacta ctactacggt 420
 atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagcctccac caagggccca 480
 tcggtcttcc cctgtggcgc ctgtccagg agcacctccg agagcacagc ggccttgggc 540
 tgcttggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacgggtg cgtggaactc aggcgctctg 600
 accagcggcg tgcacacctt ccagctgtc ctacagtctt caggactcta ctccctcagc 660
 agcgtggtga ccgtgccctc cagcaacttc ggcaccaga cctacacctg caacgtagat 720
 cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag acagttagc gcaaattgtg tgcagatgc 780
 ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc 840
 aaggacaccc tcatgatctc ccgaccctt gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc 900
 caggaagacc ccgagggtcca gtcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 960
 aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac agcacgttc gtgtggtcag cgtcctcacc 1020
 gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag gactacaagt gcaaggctc caacaaaggc 1080
 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag ggcagccccg agaaccacag 1140
 gtgtacaccc tgcccccac ccgggaggag atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc 1200
 ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1260
 gagaacaact acaagaccac acctccatg ctggactcag acggctcctt ctctctctac 1320
 agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga acgtctctc atgtccgtg 1380
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1440
 tga 1443

<210> 6
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile

35 40 45
 Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Pro Leu Gly Tyr Cys Ser Ser Thr
 115 120 125
 Ser Cys Pro Val Thr Gly Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 130 135 140
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 145 150 155 160
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
 165 170 175
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 180 185 190
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 195 200 205
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 210 215 220
 Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
 225 230 235 240
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
 245 250 255
 Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
 260 265 270
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 275 280 285
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 290 295 300
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 305 310 315 320
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 325 330 335
 Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 340 345 350

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
355 360 365

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
370 375 380

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
385 390 395 400

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
405 410 415

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
420 425 430

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
435 440 445

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
450 455 460

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475 480

<210> 7
<211> 711
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
atggaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctctgca gggccagtca gagtgttagc aacaactact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatcttt ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca 240
gacagggtca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgicag cagtatgata tctcacctat gtacagtttt 360
ggccagggga ccaagctgga gatgaaacga actgtggctg caccatctgt ctcatcttc 420
ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtcct gctgaataac 480
ttctatcca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgcctcca atcgggtaac 540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
ctgacgtga gaaagcaga ctacgagaaa cacaagctct acgcctgca agtcacccat 660
cagggcctga gctcgcccg tcaaacaggg gagagtgtta g 711

<210> 8
<211> 236
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Asp Ile Ser Pro Met Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Met
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 9
<211> 1392
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
atgaagcacc tgtggttctt cctcctgctg gtggcggctc ccagatgggt cctgtcccag 60
ctgcagcgc aggagtggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt agtagttact acgggggctg gatccgccag 180
ccccagga aggggctgga ttgattggg agtatctatt atagtgggaa cacctactac 240
aaccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gttctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacatagc 360
tgggactact ttgactactg ggaccagga accctggta ccgctctctc agcctccacc 420
aagggcccat cggcttccc cctggcgccc tgcctcagga gcacctcca gagcacagcg 480
gccctgggct gcctggtaaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540

ggcgctctga ccagcggcgt gcacacctc ccagctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 660
 aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgtgt 720
 gtcgagtgcc caccgtgccc agcaccacct gtggcaggac cgtcagtctt cctctcccc 780
 ccaaaccaca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtgtg 840
 gacgtgagcc acgaagaccc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
 cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtgttcagc 960
 gtctcaccg ttgtgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1020
 aacaaaggcc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctcctc 1260
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctccgtga tgcattaggg tctgcacaac cactacaagc agaagagcct ctcctgtct 1380
 ccgggtaaat ga 1392

<210> 10
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Gly Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Asp Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Asp
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
225 230 235 240

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
245 250 255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 11
<211> 711
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgggt cccaggttc 60
 agatgcgaca tccagatgac ccagctccca tctccgtgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcacatca ctgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggtagcctg gtatcagcag 180
 aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac tatgtgcat ccagtttgca aagtggggc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagattica ctctacat cagcagcctg 300
 cagtctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggcta acagtttccc aatcacttc 360
 ggccctggga ccaaagtga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt ctcatcttc 420
 ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480
 ttctatcca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac 540
 tccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 600
 ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660
 cagggcctga gctcggcctg cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g 711

<210> 12

<211> 236

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

<400> 14
Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Arg Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Met Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Gly Tyr Gly Asp Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
225 230 235 240

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
260 265 270

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
275 280 285

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
290 295 300

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
305 310 315 320

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
325 330 335

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
340 345 350

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
355 360 365

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 15
<211> 710
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgggt cccaggttcc 60
agatgcgaca tccagatgac ccagtcctca tcttcogtgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcataatca ctgtcgggc gagtcagggt attagcagct ggtagcctg gtatcagcag 180
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac tatgctgcat ccagttgaa aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctgtcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag atttgcaac ttactatgtc aacagtctaa cagttaccg tggacgttcg 360
gccaagggac caagtgga atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc tcatcttcc 420
cgccatctga tgagcagttg aaatctgaa ctgcctctgt tgtgtgctg ctgaataact 480
tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctcaa tgggtaact 540
cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc 600
tgacgtgag caaagcagac tacgagaac acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc 660
agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 710

<210> 16
<211> 236
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Lys Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Val Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ser Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 17
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys

<210> 18

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

Gly Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 19

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 115 120 125

Lys

<210> 20
<211> 129
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ala Asn Ser Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

Lys

<210> 21
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Pro Thr Gly

1 5 10 15
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala
 65 70 75 80
 Gln Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Ser Tyr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 115 120 125
 Thr Val Ser Ser
 130

<210> 22
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
 50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95
 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Thr Gly
 115 120 125

Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
130 135 140

Val Thr Val Ser Ser
145

<210> 23
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45

Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Cys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 24
<211> 136
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60
Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala
65 70 75 80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<220>
<221> características mezcladas
<222> (21)
<223> i

<400> 25
caggtgcagc tggagcagtc ngg 23

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 26
gctgagggag tagagtcctg agga 24

<210> 27
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 27
ttctctgatc agaattccta tcatttacct ggagacaggg agag 44

<210> 28
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 28
tatctaagct tctagacgcc accatggaca tgagggtccc cgct 44

<210> 29
<211> 45
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 29
tatctaagct tctagacgcc accatggaaa ccccagcgca gcttc 45

<210> 30
<211> 43
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 30
ttctttgatc agaattctca ctaacactct cccctgttga agc 43

<210> 31
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 31
tatctaagct tctagacgcc accatggact ggacctggag catc 44

<210> 32
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 32

tatctaagct tctagacgcc accatgaaac acctgtgggt cttc 44

<210> 33
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 33
tatctaagct tctagacgcc accatgaagc acctgtgggt cttc 44

<210> 34
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador

<400> 34
tatctaagct tctagacgcc accatggagt tggggctgtg ctgg 44

Leyendas de las figuras**Figura A**

Título: Ensayo ELISA de ligadura de ligando

Ordenada: % inhibición

Figura 1B

Título: Ensayo ELISA de fosforilación de c-Met

Ordenada: % inhibición [Met pY señal]

Figura 2

Título: Ensayo ELISA de IGF-1R en células:

anticuerpos anti-IGF-1R y anti-c-Met

Ordenada: Señal P-Tir de IGF-1R

Figura 3

Germline = línea germinal

Germ = germen

Figuras 4A, 4B, 4C, 4D y 4E

Ordenada: Volumen del tumor mm³

Absisa: Tiempo, días

Vehicle = vehículo

Figura 5

Ordenada: Inhibición de fosfoMet o Met total

Absisa: Tiempo, horas

phosphoMet = Met fosforilado

Met protein = proteína Met

plasma conc = concentración de plasma

MGM\MGM\ID-202494\WPC15777

PLIEGO REIVINDICATORIO SOLICITUD DIVISIONAL.

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la M-CSF, caracterizado porque el anticuerpo comprende una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:18 y una cadena liviana con la cadena de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, sin las secuencias señal.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0096330

Bogotá D.C., Septiembre 30 de 2011 - 16:43 43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431630006	30/09/2011	50.491.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

COLO: 15777-841-001-7

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Cali Center: (571) 6513240

Septiembre 30 de 2011 - 16:43:51



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** _____ ANTICUERPO 2.7.3 BIRIGIDO A M-CSF

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** WARNER LAMBERT COMPANY y AMGEN FREMONT INC.

DOMICILIO

MORRIS PLAINS, NEW JERSEY y FREMONT, CALIFORNIA, U.S.A,
Respectivamente

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Bogotá

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____