

SUPERINTENDENCIA DE INDUST

SIC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-073992- -00007-0000

Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 177

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-128289- -00000-0000

Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

ANTICUERPO ANTI- α MET NOVEDOSO

54. TITULO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

PIERRE FABRE MEDICAMENT

DOMICILIO

BOULOGNE-BILLANCOURT. FRANCIA

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-128289- -00000-0000

In

su

Fecha: 2013-05-24 16:35:26
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 177

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-073992- -00007-0000

Fecha: 2013-05-24 16:35:26
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 851 DIVISIONAL

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 177

AS. 124.841

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión

☒ División

☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

PIERRE FABRE MEDICAMENT

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Francia	45, place Abel Gance, F-92100	Boulogne-Billancourt
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

80.410.337

57492

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio

Calle 70 A #4-41

Ciudad

Bogotá, D.C.

Dirección electrónica

No. Fax

Número telefónico

742-2200

744-2200

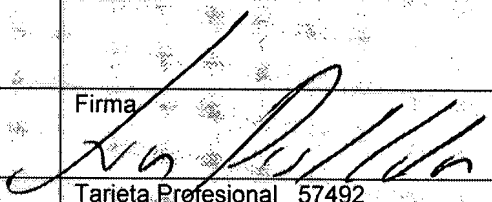
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

2

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN Expediente: De: A:	DIVISIÓN Expediente: 11 073.992 De: A:	FUSIÓN Expediente: De: A:

5. Anexos
Comprobante de pago No. <u>13- 20262</u> Fecha: <u>21.05.2013</u>
<u>13- 27269</u>
<u>13- 48417</u>

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
☒ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma		
Nombre y apellidos	Firma	
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO		
C.C 80.410.337	Tarjeta Profesional 57492	

1248413

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0048417
		Bogotá D.C., Mayo 20 de 2013 - 15:54:11

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513275	20/05/2013	11.170.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00 30.000.00
			\$30.000.00

SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-073992- -00007-0000
Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 177

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 13-128289- -00000-0000
Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

124841

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0027269
		Bogotá D.C., Marzo 19 de 2013 - 07:46:09

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513474	18/03/2013	24.248.200.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
22 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	660.000.00
			<u>\$660.000.00</u>
		=====	

SON: **SEISCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-073992- -00007-0000

Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 177

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 13-128289- -00000-0000

Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

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 Call Center: (571) 6513240

Marzo 19 de 2013 - 07:46:24

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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0020262

Bogotá D.C., Febrero 28 de 2013 - 08:38:12

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513441	27/02/2013	35.651.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				\$450.000.00

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-073882- -00007-0000

Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 177

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 13-128289- -00000-0000

Fecha: 2013-05-24 16:35:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 177

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

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

Febrero 28 de 2013 - 08:38:24

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

El Suscrito.....
En calidad de.....
De.....
Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de.....
con domicilio en.....
Oficinas principales en.....

Nombre(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseññas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en
Hoy.....de.....de...200.....
Firma.....
PIERRE FABRE MEDICAMENT
Nombre.....Société Anonyme
Cargo.....17, avenue Jean Moulin - 81106 CASTRES
45, place Abel Gance - 92100 BOULOGNE

POWER OF ATTORNEY

The Undersigned.....**Jean-Pierre COUZINIER**.....
Acting as **Chief Operating Officer**.....
Of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**.....
Company incorporated as per the laws of **France**.....
domiciled in **45, Place Abel Gance**.....
With principal offices in **Castres**.....

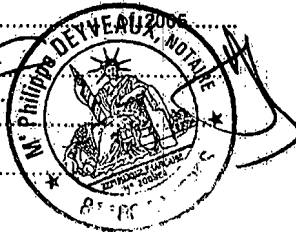
Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures; and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **Castres**

This 3rdday of...**November**.....
Signature.....
Name **Jean-Pierre COUZINIER**
Title...**Chief Operating Officer**.....



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy.....de.....de.....
personalmente compareció ante mí.....

.....
a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él/ella es.....

de.....

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las ruelas de la existencia de la sociedad.

Estado de.....

con fecha.....

y que quien confiere el presente poder es su representante.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 3rdday of November.....of 2005.....

personally appeared before me **Jean-Pierre COUZINIER**

.....
to me, known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the **Chief Operating Officer**.

of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**...

Which is legally constituted for a term not yet expired; that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company..

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of **France**....

under date of **November 3rd, 2005**.....

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative

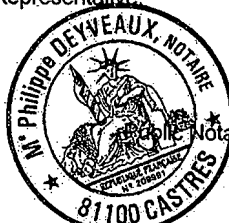
Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy.....de.....de.....
compareció(eron) ante mí.....

.....
a quien(es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)



NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this.....day of.....of.....
personally appeared before me.....

.....
who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

X

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 - République Française

Le présent acte public

2 - a été signé par Philippe DENVÉAD

3 - agissant en qualité de Notaire

4 - est revêtu du sceau de Castres

Atteste

14 NOV. 2005

5 - à TOULOUSE

6 - le

7 - Par le procureur général près la cour d'appel

8 - Sous n° 7862

9 - Sceau

10 - Signature



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **PIERRE
FABRE MEDICAMENT**, domiciliada en **45, Place Abel Gance**.

APOSTILLA

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

1. Republica Francesa

Este documento público

2. ha sido firmado por el Sr. Philippe DÉYVEAUX

3. actuando en capacidad de Notario

4. lleva el sello de la oficina de CASTRES

Certificado

5. en TOLOUSE

6. el 14 de noviembre de 2005

7. por el Procurador general para la Corte de apelaciones

8. No. 7842

9. Sello

10. Firma

(Firma)

ANTICUERPO ANTI-cMET NOVEDOSO

La presente invención se refiere a un anticuerpo divalente novedoso capaz de unirse específicamente al receptor c-Met humano y/o capaz de inhibir específicamente la actividad de tirosina quinasa de dicho receptor, así como también las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican dicho anticuerpo. Más particularmente, el anticuerpo de acuerdo con la invención es capaz de inhibir la dimerización de c-Met. La invención asimismo comprende el uso de dicho anticuerpo como un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cánceres o de cualquier patología relacionada con la sobreexpresión de dicho receptor así como también en procesos o kits para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de c-Met. La invención finalmente comprende productos y/o composiciones que comprenden ese tipo de anticuerpo en combinación con otros anticuerpos y/o compuestos químicos dirigidos contra otros factores de crecimiento involucrados en la progresión de tumores o metástasis y/o compuestos y/o agentes anticancerígenos o agentes conjugados con toxinas y su utilización para la prevención y/o el tratamiento de ciertos cánceres.

Los agentes dirigidos hacia la tirosina quinasa receptora (RTK, según sus siglas en inglés) tales como los inhibidores de trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib y gefitinib han ilustrado el interés de emplear esta clase de proteína para el tratamiento de cánceres seleccionados.

c-Met, es el miembro prototípico de una subfamilia de RTKs la cual también incluye RON y SEA. La familia de RTK de c-Met es estructuralmente diferente de otras familias de RTK y es el único receptor de alta afinidad conocido para el factor del crecimiento de hepatocitos (HGF, según sus siglas en inglés), también denominado factor de dispersión (SF, scatter factor) [D.P. Bottaro et al., Science 1991, 251: 802-804; L. Naldini et al., Eur. Mol. Biol. Org. J. 1991, 10:2867-2878]. c-Met y HGF son ampliamente expresados en una variedad de tejidos y su expresión está normalmente restringida a células de origen epitelial y mesenquimal respectivamente [M.F. Di Renzo et al., Oncogene 1991, 6:1997-2003; E. Sonnenberg et al., J. Cell. Biol. 1993, 123:223-235]. Son ambos requeridos para el desarrollo normal de los mamíferos y han demostrado ser particularmente importantes en la migración celular, diferenciación morfogénica, y organización de las estructuras tubulares tridimensionales así como también el crecimiento y la angiogénesis [F. Balducci et al., Nature 1995, 376:768-771; C.

Schmidt et al., *Nature*. 1995;373:699-702; Tsarfaty et al., *Science* 1994, 263:98-101]. Si bien la regulación controlada de c-Met y HGF ha demostrado ser importante en el desarrollo de mamíferos, mantenimiento y reparación de los tejidos [Nagayama T., Nagayama M., Kohara S., Kamiguchi H., Shibuya M., Katoh Y., Itoh J., Shinohara Y., *Brain Res.* 2004, 5;999(2):155-66; Tahara Y., Ido A., Yamamoto S., Miyata Y., Uto H., Hori T., Hayashi K., Tsubouchi H., *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307(1):146-51], su desregulación está implicada en la progresión de cánceres.

La señalización aberrante impulsada por la activación inapropiada de c-Met es una de las alteraciones más frecuentes observada en los cánceres humanos y juega un rol fundamental en la tumorigénesis y en la metástasis [Birchmeier et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:915-925; L. Trusolino y Comoglio P. M., *Nat Rev. Cancer.* 2002, 2(4):289-300].

La activación inapropiada de c-Met puede surgir mediante mecanismos dependientes e independientes del ligando, los cuales incluyen la sobreexpresión de c-Met, y/o la activación paracrina o autocrina, o a través del aumento de la mutación funcional [J.G. Christensen, Burrows J. y Salgia R., *Cancer Letters.* 2005, 226:1-26]. Sin embargo, una oligomerización del receptor c-Met, en presencia o en ausencia del ligando, es requerida para regular la afinidad de unión y la cinética de unión de la quinasa hacia ATP y los sustratos peptídicos que contienen tirosina [Hays JL, Watowich SJ, *Biochemistry*, 2004 17 de agosto, 43:10570-8]. c-Met activado recluta efectores de la señalización a su sitio "multidocking" ubicado en el dominio citoplasmático, dando como resultado la activación de diversas rutas de señalización claves, incluyendo Ras-MAPK, PI3K, Src y Stat3 [Gao CF, Vande Woude GF, *Cell Res.* 2005, 15(1):49-51; Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene.* 2000, 19(49):5582-9]. Estas rutas son esenciales para la proliferación, invasión y angiogénesis de células tumorales y para evadir la apoptosis [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene*, 2000, 19(49):5582-9; Gu H., Neel BG, *Trends Cell Biol.* Mar 2003, 13(3):122-30; Fan S., Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q., Cao Y., Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, *Oncogene.* 27 de abril 2000, 19(18):2212-23]. Por añadidura, una faceta única de la señalización de c-Met relacionada con otro RTK es su interacción reportada con complejos de adhesión focal y compañeros de la unión no quinasa tales como las integrinas $\alpha 6 \beta 4$ [Trusolino L., Bertotti A., Comoglio PM, *Cell.* 2001, 107:643-54], CD44v6 [Van der Voort R., Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M., Prevo R., Smit L., David G., Hartmann G., Gherardi E., Pals ST, J.

Biol. Chem. 1999, 274(10):6499-506], Plexina B1 o semaforinas [Giordano S., Corso S., Conrotto P., Artigiani S., Gilestro G., Barberis D., Tamagnone L., Comoglio PM, Nat Cell Biol. 2002, 4(9):720-4; Conrotto P., Valdembri D., Corso S., Serini G., Tamagnone L., Comoglio PM, Bussolino F., Giordano S., Blood. 2005, 105(11):4321-9; Conrotto P., Corso S., Gamberini S., Comoglio PM, Giordano S., Oncogene. 2004, 23:5131-7] los cuales pueden sumar adicionalmente a la complejidad de regulación de la función celular por este receptor. Finalmente, datos recientes demuestran que c-Met podría estar involucrado en la resistencia tumoral a gefitinib o erlotinib lo cual sugiere que la combinación del direccionamiento de compuestos hacia EGFR y c-Met podría ser de interés significativo [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43].

En los últimos pocos años, se han desarrollado muchas estrategias diferentes para atenuar la señalización de c-Met en líneas celulares cancerígenas. Estas estrategias incluyen i) neutralizar anticuerpos contra c-Met o HGF/SF [Cao B., Su Y., Oskarsson M., Zhao P., Kort EJ, Fisher RJ, Wang LM, Vande Woude GF, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(13):7443-8; Martens T., Schmidt NO, Eckerich C., Fillbrandt R., Merchant M., Schwall R., Westphal M., Lamszus K., Clin Cancer Res. 2006, 12(20):6144-52] o el uso de NK4 antagonista de HGF/SF para evitar la unión del ligando a c-Met [Kuba K., Matsumoto K., Date K., Shimura H., Tanaka M., Nakamura T., Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) inhibidores del sitio de unión a ATP pequeño a c-Met que bloquean la actividad de quinasas [Christensen JG, Schreck R., Burrows J., Kuruganti P., Chan E, Le P., Chen J., Wang X., Ruslim L., Blake R., Lipson KE, Ramphal J., Do S., Cui JJ, Cherrington JM, Mendel DB, Cancer Res. 2003, 63:7345-55], iii) polipéptido de dominio SH2 modificado que interfiere con el acceso al sitio "multidocking" y RNAi o ribozima que reducen la expresión del receptor o del ligando. La mayoría de estos métodos exhiben una inhibición selectiva de c-Met dando como resultado la inhibición tumoral y mostrando que c-Met podría ser interesante para la intervención terapéutica en el cáncer.

Entre las moléculas generadas para el direccionamiento hacia c-Met, algunas son anticuerpos. El más extensamente descrito es el anticuerpo anti-c-Met 5D5 generado por Genentech [WO 96/38557] el cual se comporta como un potente agonista cuando es agregado solo en diversos modelos y como un antagonista cuando se utiliza como un fragmento Fab. Una forma modificada por ingeniería genética monovalente de este anticuerpo descrito como un 5D5 armado (OA5D5) y producida como una proteína recombinante en *E. Coli* es también el

objeto de una solicitud de patente [WO 2006/015371] por Genentech. Sin embargo, esta molécula que no podría ser considerada como un anticuerpo debido a su estructura en particular, exhibe también mutaciones que podrían ser inmunógenas en seres humanos. En términos de actividad, esta molécula no glicosilada está desprovista de funciones efectoras y finalmente, no hay datos claros que demuestran que OA5D5 inhibe la dimerización de c-Met. Adicionalmente, cuando se ensaya en el modelo in vivo de G55, una línea de células de glioblastoma que expresa c-Met pero no ARNm de HGF y proteína y que crece independientemente del ligando, el anti-c-Met armado no tuvo efecto significativo alguno sobre el crecimiento tumoral de G55 lo cual sugiere que OA5D5 actúa principalmente bloqueando la unión de HGF y no es capaz de dirigirse hacia tumores activados independientemente de HGF [Martens T. et al, Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152].

Otro anticuerpo que se dirige hacia c-Met es descrito por Pfizer como un anticuerpo que actúa "predominantemente como antagonista de c-Met, y en algunos casos como un agonista de c-Met" [WO 2005/016382]. No hay datos descritos en esta solicitud que muestren efecto alguno de los anticuerpos de Pfizer sobre la dimerización de c-Met.

Uno de los aspectos innovadores de la presente invención consiste en generar un anticuerpo monoclonal quimérico y/o humanizado sin actividad agonista intrínseca e inhibir la dimerización de c-Met. Más particularmente, un aspecto innovador de la presente invención consiste en generar un anticuerpo monoclonal quimérico y/o humanizado con actividad antagonista e inhibir la dimerización de c-Met.

Además de dirigirse contra tumores dependientes de ligando, este método también disminuirá las activaciones independientes del ligando de c-Met debido a su sobreexpresión o mutaciones de los dominios intracelulares los cuales permanecieron dependientes de la oligomerización para la señalización. Otro aspecto de la actividad de este anticuerpo podría ser un impedimento estérico para la interacción de c-Met con sus socios que dará como resultado un menoscabo de las funciones de c-Met. Este anticuerpo es humanizado y modificado genéticamente con preferencia, aunque sin limitarse a, como IgG1 humana para obtener funciones efectoras tales como ADCC y CDC además de funciones vinculadas con el bloqueo específico del receptor c-Met.

Sorprendentemente, por primera vez, los inventores han podido generar un anticuerpo antagonista monoclonal quimérico y/o humanizado capaz de unirse a c-

h

Met pero también capaz de inhibir la dimerización de c-Met, siendo dicho anticuerpo monoclonal divalente en oposición a los anticuerpos antagonistas existentes dirigidos contra c-Met. Si es cierto que, en la técnica anterior, algunas veces se sugiere que un anticuerpo capaz de inhibir la dimerización de c-Met con sus socios podría ser un anticuerpo interesante, nunca se ha descrito, o claramente sugerido, un anticuerpo capaz de hacerlo. Por añadidura, en cuanto a la especificidad del anticuerpo, no fue evidente para nada el tener éxito en la generación de ese tipo de anticuerpo divalente activo.

Según lo explicado anteriormente, la inhibición de la dimerización de c-Met es un aspecto capital de la invención ya que ese tipo de anticuerpos presentarán un real interés para una población más grande de pacientes. No solo el cáncer de c-Met activado dependiente del ligando, como resultó ser el caso hasta la presente invención, sino además el cáncer de c-Met activado independiente del ligando pudo tratarse con los anticuerpos generados mediante el proceso de la presente invención.

Los anticuerpos fueron evaluados mediante análisis BRET sobre células que expresan tanto c-Met-RLuc/c-Met-YFP y se seleccionaron por su capacidad de inhibir por lo menos 40%, con preferencia 45%, 50%, 55% y con máxima preferencia 60% de la señal de BRET.

La tecnología BRET es conocida como siendo representativa de la dimerización proteica [Angers et al., PNAS, 2000, 97:3684-89].

La tecnología BRET es bien conocida por el experto en la técnica y será detallada en los siguientes ejemplos. Más particularmente, BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer (Transferencia de Energía por Resonancia de Bioluminiscencia)) es un transferencia de energía no radiactiva que ocurre entre un donante bioluminiscente (Renilla Luciferasa (RLuc)) y un aceptor fluorescente, un mutante de GFP (Green Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Verde)) o YFP (Yellow fluorescent protein (Proteína fluorescente amarilla)). En el presente caso, se utilizó EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein (Proteína Fluorescente Amarilla Potenciada)). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y la distancia entre el donante y el aceptor. Luego, la transferencia de energía puede ocurrir solamente si las dos moléculas están en cercana proximidad (1-10 nm). Esta propiedad se utiliza para generar ensayos de interacción proteína- proteína. De hecho, a fin de estudiar la interacción entre dos socios, el primero es genéticamente fusionado a la Renilla Luciferasa y el segundo al mutante amarillo de la GFP. Las proteínas de fusión

son generalmente, aunque no obligatoriamente, expresadas en células de mamífero. En presencia de su sustrato permeable a la membrana (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante de GFP está más cerca que 10 nm de la Rluc, puede producirse una transferencia energética y puede detectarse una señal amarilla adicional. La señal de BRET se mide como la relación entre la luz emitida por el aceptor y la luz emitida por el donante. De modo que la señal de BRET aumentará a medida que las dos proteínas de fusión se llevan a proximidad o si un cambio conformacional trae a Rluc y el mutante de GFP más cerca.

Si el análisis de BRET consiste en una realización preferida, cualquier método conocido por el experto en la técnica puede utilizarse para medir la dimerización de c-Met. Sin limitación, pueden mencionarse las siguientes tecnologías: FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia)), HTRF (Homogenous Time resolved Fluorescence (Fluorescencia Homogénea resuelta en el Tiempo)), FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (Microscopía por Imágenes de Tiempo de Vida de Fluorescencia)) o SW-FCCS single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy (espectroscopia de correlación cruzada de fluorescencia de longitud de onda única).

Otras tecnologías clásicas también podrían utilizarse, tales como Co-inmunoprecipitación, Alpha screen, Entrecruzamiento químico, Doble Híbrido, Cromatografía de Afinidad, ELISA o Far western blot.

Los términos “anticuerpo”, “anticuerpos” o “inmunoglobulina” se utilizan de manera indistinta en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ej., anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes o anticuerpos multiespecíficos (por ej., anticuerpos biespecíficos siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada).

Más particularmente, dicha molécula consiste en una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H, del inglés “heavy”) y dos cadenas ligeras (L, del inglés “light”) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (o dominio) (abreviado en esta invención HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviado en esta invención como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está

compuesta por un dominio, CL. Las regiones de VH y VL puede estar adicionalmente subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, siglas correspondientes a "complementarity determining regions"), entremezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR, siglas correspondientes a "framework regions"). Cada VH y VL está compuesta por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el término amino hasta el término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden intervenir en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huéspedes, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ej. células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complementos clásico.

Las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas pueden estar divididas en tres regiones funcionales: la región Fd, la región bisagra, y la región Fc (cristalizable por fragmento). La región Fd comprende los dominios VH y CHI y, en combinación con la cadena ligera, forma Fab – el fragmento de unión al antígeno. El fragmento Fc es responsable de las funciones efectoras de inmunoglobulinas, lo cual incluye, por ejemplo, la fijación al complemento y la unión a los receptores de Fc cognados de las células efectoras. La región bisagra, encontrada en las clases de inmunoglobulinas IgG, IgA, y IgD, actúa como un espaciador flexible que permite que la porción de Fab se mueva libremente en el espacio con relación a la región Fc. Los dominios bisagra son estructuralmente diversos, variando en la secuencia como en la longitud entre las clases y subclases de inmunoglobulinas.

De acuerdo con estudios cristalográficos, la región bisagra de inmunoglobulina puede estar adicionalmente subdividida estructural y funcionalmente en tres regiones: la bisagra superior, el núcleo y la bisagra inferior (Shin et al., Immunological Reviews 130:87, 1992). La bisagra superior incluye aminoácidos desde el extremo carboxilo de CHI hasta el primer residuo en la bisagra que restringe el movimiento, en general el primer residuo cisteína que forma un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas. La longitud de la región bisagra superior se correlaciona con la flexibilidad segmental del anticuerpo. La región bisagra núcleo contiene los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas. La región bisagra inferior une el extremo terminal amino de, e incluye los residuos en el dominio CH2. La región bisagra núcleo de IgG1 humana contiene la secuencia Cys-Pro-Pro-Cys que, cuando se dimeriza mediante la

formulación de un enlace disulfuro, da como resultado un octapéptido cíclico que se cree que actúa como un pivote, confiriendo de ese modo flexibilidad. Los cambios conformacionales permitidos por la estructura y flexibilidad de la secuencia polipeptídica de la región bisagra de la inmunoglobulina pueden afectar las funciones efectoras de la porción Fc del anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal" se utiliza de acuerdo con su significado común para denotar un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones de presentación natural que pueden estar presentes en cantidades menores. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que es el resultado de la proliferación de un único clon de células (por ej., células de hibridoma, células huésped eucarióticas transfectadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, células huésped procarióticas transformadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.), y el cual es generalmente caracterizado por cadenas pesadas de una única clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un único antígeno. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes, o epítipo, cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un único determinante en el antígeno.

En la presente descripción, los términos polipéptidos, secuencias de polipéptidos, secuencias de aminoácidos, péptidos y proteínas unidos a compuestos de anticuerpo o a su secuencia son intercambiables.

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o a un fragmento o derivado del mismo funcional divalente, capaz de inhibir la dimerización de c-Met y que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 1, 2 y 3 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con secuencias SEC ID Nos. 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 5, 6 y 7 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nos. 5, 6 o 7, estando dicho anticuerpo adicionalmente caracterizado porque también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 56.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, según lo descrito anteriormente caracterizado porque también contempla una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 57.

En otras palabras, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, capaz de inhibir la dimerización de c-Met y que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 1, 2 y 3 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nos. 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 5, 6 y 7 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nos. 5, 6 o 7, estando dicho anticuerpo adicionalmente caracterizado porque también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 57.

Más particularmente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, según lo descrito anteriormente caracterizado porque también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 21.

En otras palabras, la invención se refiere además a un anticuerpo monoclonal, o su fragmento o derivado funcional divalente, capaz de inhibir la dimerización de c-Met y que comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 1, 2 y 3 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nos. 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 con respectivamente las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 5, 6 y 7 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nos. 5, 6 o 7, estando dicho anticuerpo adicionalmente caracterizado porque también comprende una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 21.

Como será evidente para el experto en la técnica, las secuencias de consenso SEC ID Nos. 57 y 21 están comprendidas en la secuencia de consenso SEC ID No. 56.

A

Tabla 1

	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10	#11	#12	#13	#14
SEC ID NO 56	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	X11	X12	C	X14
SEC ID NO 57	X1	X2	X3	C	X5	X6	X7	X8	X9	C	P	P	C	P
SEC ID NO 21	X1	X2	X3	C	X5	-	C	X8	X9	C	X11	X12	C	X14

Para SEC ID No. 56:

X1: P, R, C, -X5: D, C, G, -X8: H, V, K, -X12: P, -
X2: K, C, R, -X6: K, C, -X9: T, C, E, P, -X14: P, T
X3: S, C, D, -X7: T, C, -X11: P, I

La expresión “fragmentos y derivados funcionales” será definida en detalle más adelante en la presente memoria descriptiva.

Por regiones CDR o CDR(s), se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas según lo definido por IMGT.

La numeración única de IMGT ha sido definida para comparar los dominios variables cualquiera sea el receptor del antígeno, el tipo de cadena o la especie [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1er-CYS), triptófano 41 (TRP-CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2da-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única de IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones estructurales (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Como los espacios vacíos representan posiciones no ocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (mostradas entre corchetes y separadas por puntos, por ej. [8.8.13]) se vuelven información crucial. La numeración única de IMGT se utiliza en

representaciones gráficas en 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], y en las estructuras en 3D en IMGT/estructura 3D-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Existen tres CDRs de cadena pesada y 3 CDRs de cadena ligera. El término CDR o CDRs se utiliza en esta invención a fin de indicar, de acuerdo con el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones las cuales contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo para el antígeno o el epítipo el cual reconoce.

Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos en el sentido de la presente invención, tiene el propósito de indicar un porcentaje de nucleótidos o de residuos aminoácidos idénticos entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenidas después de la mejor alineación (alineación óptima), siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferentes entre las dos secuencias son distribuidas al azar y por toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se llevan a cabo, tradicionalmente, comparando estas secuencias después de haberlas alineado en forma óptima, siendo dicha comparación capaz de ser llevada a cabo por segmento o por "ventana de comparación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48: 443], por medio del método de investigación de similitudes de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], por medio de programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o sino mediante programa informático de comparación BLAST N o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas en forma óptima y en las cuales la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos a ser comparadas pueden comprender adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando la cantidad de posiciones idénticas para las cuales el nucleótido o el residuo aminoácido es idéntico entre

las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 a fin de obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST, "secuencias BLAST 2" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros utilizados aquellos proporcionados por error (en particular para los parámetros "penalidad de espacio vacío abierto": 5, y "penalidad de extensión de espacio vacío": 2; siendo la matriz seleccionada, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), el porcentaje de identidad entre las dos secuencias que se van a comparar es calculado directamente por el programa.

Por secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80%, con preferencia 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, aquellas que tienen, con respecto a la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una delección, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, una truncación o una elongación son preferidas. En el caso de una sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, las sustituciones son preferidas en las cuales los aminoácidos sustituidos son reemplazados por aminoácidos "equivalentes". La expresión "aminoácidos equivalentes" tiene el propósito de indicar cualquier aminoácido capaz de ser sustituido con uno de los aminoácidos de la estructura de base sin, sin embargo, modificar esencialmente las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y como serán definidos más adelante, especialmente en los ejemplos. Estos aminoácidos equivalentes pueden ser determinados ya sea basándose en su homología estructural con los aminoácidos que los mismos reemplazan, o en los resultados de ensayos comparativos de actividad biológica entre los diferentes anticuerpos capaces de llevarse a cabo.

A modo de ejemplo, se hace mención de las posibilidades de sustitución capaces de ser llevadas a cabo sin dar como resultado una modificación profunda de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente.

Como ejemplo no limitativo, la siguiente tabla 2 proporciona posibilidades de sustitución concebibles con una conservación de la actividad biológica del anticuerpo modificado. Las sustituciones inversas también son, naturalmente, posibles en las mismas condiciones.

20

Tabla 2

Residuo original	Sustitución(es)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Debe entenderse aquí que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, no están en su medio ambiente natural pero que han sido capaces de ser aislados u obtenidos por purificación de fuentes naturales, o sino han sido obtenidos mediante recombinación genética, o mediante síntesis química, y pueden entonces contener aminoácidos no naturales como será descrito más adelante.

También debe entenderse, según lo mencionado previamente, que la invención se refiere, más particularmente, a un anticuerpo divalente quimérico y/o humanizado, o cualquier fragmento o derivado funcional divalente, con una actividad antagonista. Los anticuerpos divalentes de la técnica anterior son agonistas o agonistas parciales. El anticuerpo monoclonal de la invención, incluyendo una bisagra modificada según lo descrito previamente, es decir,

21

incluyendo una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 56, 57 o 21, es novedoso y presenta la particularidad de tener una actividad antagonista mejorada en comparación con el anticuerpo quimérico o humanizado 224G11 sin ese tipo de bisagra modificada como será evidente de los ejemplos que figuran más adelante.

En oposición a la técnica anterior, los inventores han obtenido una actividad antagonista mejorada sin modificar el formato del anticuerpo. De hecho, en la técnica previa más cercana representada por el anticuerpo 5D5, ha sido necesario desarrollar un fragmento monovalente del anticuerpo para generar una actividad antagonista. En la presente solicitud, mediante el uso de la bisagra de la invención, es posible, por primera vez, obtener un anticuerpo divalente completo con mayor actividad antagonista, y esto se opone al conocimiento general.

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención comprende una región bisagra que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEC ID Nos. 22 a 28 y 58 a 72, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEC ID Nos. 22 a 28 y 58 a 72.

Para más claridad, las siguientes tablas 3 y 4 reagrupan a los aminoácidos y secuencias nucleotídicas de las diferentes bisagras preferidas de la invención.

22

Tabla 3

SEC ID No.	Aminoácidos	SEC ID No.	Nucleótidos
22	RKCCVECPCP	29	AGGAAGTGCTGTGTGGAGTGCCCCCCTGC CCA
23	PRDCGCKPCICT	30	CCCCGGGACTGTGGGTGCAAGCCTTGCATT TGTACC
24	PKSCGCKPCICT	31	CCCAAGAGCTGTGGGTGCAAGCCTTGCATT TGTACC
25	PKSCGCKPCICP	32	CCAAAGAGCTGCGGCTGCAAGCCTTGTATC TGTCCC
26	PRDCGCKPCPP CP	33	CCACGGGACTGTGGCTGCAAGCCCTGCCCT CCGTGTCCA
27	PRDCGCHTCPP CP	34	CCCAGAGACTGTGGGTGTCACACCTGCCCT CCTTGTCT
28	PKSCDCHCPCP	35	CCCAAAGCTGCGATTGCCACTGTCCTCCA TGTCCA

Tabla 4

SEC ID No.	Aminoácidos	SEC ID No.	Nucleótidos
58	CKSCDKTHTCPPC P	73	TGCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCT GTCCCCCCTGCCCT
59	PCSCDKTHTCPPC P	74	CCCTGCAGCTGCGACAAGACCCACACCT GTCCCCCCTGCCCT
60	PKCCDKTHTCPPC P	75	CCCAAGTGCTGCGACAAGACCCACACCT GTCCCCCCTGCCCT
61	PKSCCKTHTCPPC P	76	CCTAAGAGCTGTTGCAAGACCCACACCTG TCCCCCCTGCCCT
62	PKSCDCTHTCPPC P	77	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACACCT GTCCCCCCTGCCCT
63	PKSCDKCHTCPPC P	78	CCCAAGAGCTGCGACAAGTGCCACACCT GTCCCCCCTGCCCT
64	PKSCDKTHCCPPC P	79	CCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACTGCT GTCCCCCCTGCCCT

23

65	KCDKTHTCPPCP	80	AAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCC CCTGCCCT
66	PKSCDCHTCPPCP	81	CCCAAGAGCTGCGACTGCCACACCTGTC CCCCCTGCCCT
67	PKSCDCTHCPPCP	82	CCCAAGAGCTGCGACTGCACCCACTGCC CCCCCTGCCCT
68	PCSKHTCPPCP	83	CCCTGCAGCTGCAAGCACACCTGTCCCC CCTGCCCT
69	PSCCTHTCPPCP	84	CCTAGCTGCTGCACCCACACCTGTCCCC CTGCCCT
70	PSCDKHCCPPCP	85	CCCAGCTGCGACAAGCACTGCTGCCCC CCTGCCCT
71	PKSCTCPPCP	86	CCCAAGAGCTGCACCTGTCCCCCTTGTC T
72	PKSCDKCVECPC P	87	CCCAAGAGCTGCGATAAGTGCGTGGAGT GCCCCCCTTGTCCT

De acuerdo con un primer enfoque, el anticuerpo será definido por su secuencia de cadena pesada. Más particularmente, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, es caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una CDR seleccionada entre las CDRs que comprenden las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 1 a 3.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

- SEC ID No. 1: GYIFTAYT
- SEC ID No. 2: IKPNNGLA
- SEC ID No. 3: ARSEITTEFDY

De acuerdo con un aspecto preferido, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende por lo menos una, preferentemente dos, y con máxima preferencia tres, CDR(s) seleccionadas entre CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

- CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 1,
- CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 2,
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 3.

En un segundo enfoque, el anticuerpo será ahora definido por su secuencia de cadena ligera. Más particularmente, de acuerdo con un segundo aspecto particular de la invención, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, es caracterizado porque comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una CDR seleccionada entre CDRs que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID Nos. 5 a 7.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

SEC ID No. 5: ESVDSYANSF

SEC ID No. 6: RAS

SEC ID No. 7: QQSKEDPLT

De acuerdo con otro aspecto preferido, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende por lo menos una, preferentemente dos, y con máxima preferencia tres, CDR(s) seleccionadas entre CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

- CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 5,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 6,
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 7.

El hibridoma murino capaz de secretar anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención, especialmente hibridoma de origen murino, fue depositado en el CNCM (Institut Pasteur, París, Francia) el 14/03/2007 bajo el número CNCM I-3731.

En la presente solicitud, se prefiere que IgG1 obtengan funciones efectoras, y con máxima preferencia, ADCC y CDC.

El experto en la técnica reconocerá que las funciones efectoras incluyen, por ejemplo, unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, según sus siglas en inglés); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC, según sus siglas en inglés); fagocitosis; y regulación descendente de receptores de superficie celular (por ej. el receptor de células B; BCR, según sus siglas en inglés).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, son preferentemente anticuerpos monoclonales específicos, especialmente de origen murino, quimérico o humanizado, los cuales pueden ser obtenidos de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos por el experto en la técnica.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos o derivados funcionales, especialmente de origen murino, es posible

25

hacer referencia a técnicas las cuales son descritas en particular en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden obtenerse, por ejemplo, de una célula animal inmunizada con el c-Met, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención. Dicho c-Met, o uno de sus fragmentos, puede especialmente ser producido de acuerdo con los métodos de elaboración usuales, mediante recombinación genética comenzando con una secuencia de ácidos nucleicos contenida en la secuencia de ADNc que codifica al c-Met o por síntesis peptídica comenzando a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica del c-Met.

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención puede ser, por ejemplo, purificados en una columna de afinidad en la cual el c-Met o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención ha sido previamente inmovilizado. Más particularmente, dichos anticuerpos monoclonales pueden ser purificados por cromatografía en proteína A y/o G, seguido o no seguido por cromatografía de intercambio iónico que apunta a eliminar los contaminantes proteicos residuales así como también el ADN y el LPS, en si mismo seguido o no seguido por cromatografía de exclusión en gel Sepharose™ a fin de eliminar los potenciales agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una forma aun más preferida, la totalidad de estas técnicas pueden utilizarse en forma simultánea o consecutiva.

El anticuerpo de la invención, o su fragmento o derivado funcional divalente, consiste preferentemente en un anticuerpo quimérico.

Por anticuerpo quimérico, se pretende indicar un anticuerpo el cual contiene una región variable natural (de cadena pesada y cadena ligera) derivada de un anticuerpo de una especie determinada en combinación con las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dicha especie determinada (por ej., ratón, caballo, conejo, perro, vaca, gallina, etc.).

Los anticuerpos o sus fragmentos del tipo quimérico de acuerdo con la invención pueden prepararse utilizando las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede ser producido clonando un ADN

recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal, no humano, especialmente murino, de acuerdo con la invención y una secuencia que codifica la región constante de anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de la invención codificado por ese tipo de gen recombinante será, por ejemplo, una quimera de ratón- hombre, determinándose la especificidad de este anticuerpo por la región variable derivada del ADN murino y su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, es posible, por ejemplo, referirse a los documentos Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) o Patente de los Estados Unidos No. US 4.816.567.

Más particularmente, dicho anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, comprende un dominio variable de cadena pesada quimérico de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 46.

SEC.

ID No. 46: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLGESLDWI
GGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCARSEITT
EFDYWGQGTALTVSS

Más particularmente, dicho anticuerpo, o un fragmento o derivado del mismo funcional, comprende un dominio variable de cadena ligera quimérico de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 47.

SEC

ID No. 47: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQQKPGQP
PKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSKEDPLTFG
SGTKLEMKR

Más particularmente, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11][IgG2quim], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de

27

cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 22.

En la presente solicitud, el uso de corchetes no es necesario y, como en el ejemplo, la referencia [224G11][IgG2quim] debe ser considerada como idéntica a 224G11IgG2chim. En un mismo modo, para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo murino, la expresión murino o la letra n puede agregarse para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, la expresión quim o la letra c puede agregarse y ; para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, puede agregarse la expresión, hz, Hz o la letra h. Como un ejemplo, el anticuerpo quimérico 224G1IgG2 puede ser denominado c224G11IgG2, c224G11[IgG2], c[224G11]IgG2, c[224G11][IgG2], 224G11IgG2quim, 224G11[IgG2quim], [224G11]IgG2quim o [224G11][IgG2quim].

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11][TH7quim], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 28.

En la presente solicitud, la referencia TH7 debe ser considerada como idéntica a C7Δ6-9 o TH7C7Δ6-9. El símbolo Δ significa delección.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11][MHquim], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 23.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11][MUP9Hquim], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 26.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11][MMCHquim], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera

que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 24.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C1], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 58.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C2], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 59.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C3], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 60.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C5], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 61.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C6], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 62.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C7], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que

comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 63.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C9], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 64.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [Δ 1-3], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 65.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C7 Δ 6], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 66.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C6 Δ 9], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 67.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C2 Δ 5-7], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 68.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C5 Δ 2-6], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que

comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 69.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [C9Δ2-7], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 70.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [Δ5-6-7-8], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 71.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [IgG1/IgG2], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 46, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 47, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 72.

El anticuerpo de la invención, o su fragmento o derivado funcional divalente, consiste preferentemente en un anticuerpo humano.

El término "anticuerpo humano" incluye a todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, todos los dominios variables y constantes (o regiones) son derivados de secuencia de inmunoglobulina humana (anticuerpo totalmente humano). En otras palabras, incluye cualquier anticuerpo el cual tiene regiones variables y constantes (en caso de estar presentes) derivado de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, es decir, que posee una secuencia de aminoácidos la cual corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido preparado utilizando cualquiera de las técnicas para la preparación de anticuerpos humanos conocidas por el expertos en la técnica.

En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos mediante un hibridoma el cual incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que

31

comprende un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

Como ejemplo para ese tipo de ratón transgénico, puede mencionarse el XENOMOUSE™ el cual es una cepa de ratón modificada por ingeniería genética que comprende fragmentos grandes de los sitios de inmunoglobulina humana y es deficiente en la producción de anticuerpos de ratón (Green et al., 1994, Nature Genetics, 7:13-21). El XENOMOUSE™ produce un repertorio humano del tipo adulto de anticuerpos completamente humanos, y genera anticuerpos monoclonales humanos específico para el antígeno. Una segunda generación XENOMOUSE™ contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos (Green & Jakobovits, 1998, J. Exp. Med., 188:483-495).

Cualquier otra técnica conocida por el experto en la técnica, tal como la técnica de exhibición de fagos, también puede utilizarse para la generación de anticuerpo humano de acuerdo con la invención.

El anticuerpo de la invención, o su fragmento o derivado funcional divalente, consiste preferentemente en un anticuerpo humanizado.

Mediante la expresión "anticuerpo humanizado", se pretende indicar un anticuerpo el cual contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, las otras partes de la molécula del anticuerpo son derivadas de uno (o de varios) anticuerpos humanos. Asimismo, algunos de los residuos de los segmentos del esqueleto (denominado FR) pueden ser modificados a fin de conservar la afinidad de la unión (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

Los anticuerpos humanizados de acuerdo con la invención o sus fragmentos pueden prepararse mediante técnicas conocidas por el experto en la técnica (tales como, por ejemplo, aquellas descritas en los documentos Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; o Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992).

El experto en la técnica conoce otros métodos de humanización como, por ejemplo, el método "CDR Grafting" ("Injerto de CDR") descrito por Protein Design Lab (PDL) en las solicitudes de patente EP 0 451261, EP 0 682 040, EP 0 9127, EP 0 566 647 o US 5.530.101, US 6.180.370, US 5.585.089 y US 5.693.761. También pueden mencionarse las siguientes solicitudes de patentes: US 5.639.641; US 6.054.297; US 5.886.152 y US 5.877.293.

Más particularmente, dicho anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional,

comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 4.

SEC.ID No. 4: QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWVRQAPGQ
GLEWMGWIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCA
RSEITTEFDYWGQGTLVTVSS

Más particularmente, dicho anticuerpo, o su fragmento o derivado funcional, comprende un dominio variable de cadena ligera humanizado seleccionado del grupo de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 8, 9 o 10 o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 8, 9 o 10.

SEC.ID No. 8: DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYANSFMHWYQQKPG
QPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEDPL
TFGGGTKVEIKR

SEC.ID No. 9: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYANSFMHWYQQKP
GQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEDP
LTFGGGTKVEIKR

SEC.ID No. 10: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVD SYANSFLHWYQQKP
GQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEDP
LTFGGGTKVEIKR

Más particularmente, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [IgG2Hz1], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 8, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 22.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [IgG2Hz2], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 9, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 22.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11]

[IgG2Hz3], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 10, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 22.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [TH7Hz1], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 8, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 28.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [TH7z2], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 9, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 28.

En otro aspecto, un anticuerpo preferido, o su fragmento o derivado funcional divalente, de acuerdo con la invención y denominado [224G11] [TH7Hz3], comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 4, un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 10, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 28.

En otro aspecto, los anticuerpos de la invención pueden describirse por sus cadenas pesadas y ligeras totales, respectivamente.

Como un ejemplo, el anticuerpo [224G11] [IgG2quim] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 50, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 50, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [TH7quim] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 51, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 51, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No.

52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C1] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 88, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 88, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C2] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 89, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 89, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C3] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 90, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 90, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C5] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 91, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 91, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C6] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 92, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 92, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que

35

tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C7] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 93, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 93, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C9] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 94, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 94, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [Δ 1-3] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 95, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 95, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C7 Δ 6] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 96, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 96, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C6 Δ 9] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 97, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 97, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No.

52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C2Δ5-7] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 98, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 98, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C5Δ2-6] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 99, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 99, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [C9Δ2-7] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 100, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 100, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [Δ5-6-7-8] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 101, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 101, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [IgG1/IgG2] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 102, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 102, y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No.

37

52, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 52.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [IgG2Hz1] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 36, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 36 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 38, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 38.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [IgG2Hz2] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 36, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 36 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 39, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 39.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [IgG2Hz3] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 36, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 36 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 40, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 40.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [TH7Hz1] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 37, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 37 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 38, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 38.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [TH7Hz2] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 37, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 37 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No.

78

39, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 39.

Como otro ejemplo, el anticuerpo [224G11] [TH7Hz3] de la invención comprende una cadena pesada completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 37, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 37 y una cadena ligera completa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID No. 40, o una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEC ID No. 40.

Otros ejemplos de anticuerpos, o sus derivados, de acuerdo con la invención comprende cadena pesadas completas que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEC ID No. 88 a 102 (secuencias nucleotídicas correspondientes son SEC ID Nos. 103 a 117).

Por "fragmento funcional" de un anticuerpo de acuerdo con la invención, tiene el propósito de indicar en particular un fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fv, scFv (sc por cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento del cual el tiempo de vida media se habría incrementado mediante modificación química, tal como la adición de poli(alquilen)glicol tal como poli(etilen)glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" por Poli(Etilen) Glicol), o mediante la incorporación en un liposoma, teniendo dichos fragmentos por lo menos una de las CDRs características de secuencia SEC ID Nos. 1 a 3 y de 5 a 7 de acuerdo con la invención, y, especialmente, en que es capaz de ejercer en forma general una actividad parcial uniforme del anticuerpo del cual descende, tal como, en particular, la capacidad de reconocer y de unirse al c-Met, y, en caso necesario, inhibir la actividad del c-Met.

Con preferencia, dichos fragmentos funcionales estarán constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual descende y una afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, en un modo más preferido hasta por lo menos 1/10, de la del anticuerpo del cual descende, con respecto al c-Met. Ese tipo de fragmento funcional contendrá como mínimo 5 aminoácidos, con preferencia 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 y 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del cual descende.

Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos de tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, los cuales generalmente tienen la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual descenden. En una realización más preferida de la invención, estos fragmentos son seleccionados entre fragmentos divalentes tales como fragmentos F(ab')₂. De acuerdo con la presente invención, los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden obtenerse comenzando de anticuerpos tales como los descritos anteriormente mediante métodos tales como digestión por enzimas, tal como pepsina y/o papaína y/o por disociación de los puentes disulfuro mediante reducción química. De otro modo, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención pueden obtenerse mediante técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por el experto en la técnica o de otro modo mediante síntesis peptídica por medio de, por ejemplo, sintetizadores peptídicos automáticos tales como aquellos suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc.

Por "fragmento divalente", debe entenderse cualquier fragmento de anticuerpo que comprende dos brazos y, más particularmente, fragmentos F(ab')₂.

Por "derivados" de un anticuerpo de acuerdo con la invención, se quiere decir una proteína de unión que comprende una estructura proteica y por lo menos una de las CDRs seleccionadas del anticuerpo original a fin de mantener la capacidad de unión. Dichos compuestos son bien conocidos por el experto en la técnica y serán descritos en forma más detallada en la siguiente memoria descriptiva.

Más particularmente, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención es caracterizado porque dicho derivado consiste en una proteína de unión que comprende una estructura en la cual al menos una CDR ha sido injertada para la conservación de las propiedades de reconocimiento paratópicas del anticuerpo original.

Una o varias secuencias a través de las 6 secuencias de CDR descritas en la invención pueden presentarse en una estructura proteica. En este caso, la estructura proteica reproduce el armazón proteico con pliegue apropiado de las CDR(s) injertada(s), permitiéndole(s) mantener sus propiedades de reconocimiento paratópicas del antígeno.

El experto en la técnica sabe como seleccionar la estructura proteica sobre la cual al menos una CDR seleccionada del anticuerpo original podría ser injertada. Más particularmente, se sabe que, para ser seleccionada, dicha

estructura debería exhibir diversas características como sigue (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187):

- filogenéticamente buena conservación,
- arquitectura robusta con una organización molecular tridimensional bien conocida (tal como, por ejemplo, cristalografía o RMN),
- tamaño pequeño,
- ningún grado o solamente bajo grado de modificaciones post-traducción,
- fácil de producir, expresar y purificar.

Dicha estructura proteica puede ser, aunque sin limitarse a, una estructura seleccionada del grupo formado por fibronectina y preferentemente el décimo dominio del tipo III de fibronectina (FNfn10), lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), el derivado de proteína Z del dominio B de la proteína A estafilocócica, tioredoxina A o cualquier proteína con dominio repetido tal como "repetición de anquirina" (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No.4, 1700-1705), "repetición de armadillo", "repetición rica en leucina" o "repetición de tetratricopéptido".

También puede mencionarse el derivado de estructura de toxinas (tales como, por ejemplo, toxinas de escorpión, insecto, planta o molusco) o inhibidores proteicos de la sintasa de óxido nítrico neuronal (PIN, según sus siglas en inglés).

Como un ejemplo no limitativo de dichas construcciones híbridas, puede mencionarse la inserción de la CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, es decir, el anticuerpo 13B8.2, en uno de los lazos expuestos de la PIN. Las propiedades de unión de la proteína de unión obtenida siguen siendo similares al anticuerpo original (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344). También puede mencionarse el injerto de la CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo VHH anti-lisozima en un lazo de neocarzinostatina (Nicaise et al., 2004).

Según lo mencionado con anterioridad, dicha estructura proteica puede comprender entre 1 y 6 CDR(s) del anticuerpo original. En una realización preferida, pero sin limitación alguna, el experto en la técnica seleccionaría por lo menos una CDR de la cadena pesada, sabiendo que dicha cadena pesada está particularmente implicada en la especificidad del anticuerpo. La selección de la(s) CDR(s) de interés será evidente para el experto en la técnica con método conocido (BES et al., FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Como una evidencia, estos ejemplos no son limitativos y cualquier otra estructura conocida o descrita debe estar incluida en la presente memoria descriptiva.

De acuerdo con un aspecto novedoso, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado porque se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos:

a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención;

b) una secuencia de ácidos nucleicos que comprende las secuencias SEC ID No. 11, SEC ID No. 12, SEC ID No. 13 y las secuencias SEC ID No. 15, SEC ID No. 16 y SEC ID No. 17;

c) una secuencia de ácidos nucleicos que comprende las secuencias SEC ID No. 14 y SEC ID No. 18, 19 o 20;

d) los correspondientes ácidos nucleicos de ARN de los ácidos nucleicos según lo definido en b) o c);

e) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos según lo definido en a), b) y c); y

f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridación bajo condiciones de elevada severidad con por lo menos una de las CDRs de la secuencia SEC ID Nos. 11 a 13 y 15 a 17.

De acuerdo con aun otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado porque se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos:

- un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la presente invención y donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la región bisagra de dicho anticuerpo comprende o tiene una secuencia seleccionada entre el grupo formado por las secuencias SEC ID Nos. 29 a 35 y SEC ID Nos. 73 a 87.

Por ácido nucleico, nucleico o secuencia de ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, secuencia de polinucleótidos, secuencia de nucleótidos, términos que serán empleados en forma indistinta en la presente invención, se pretende indicar una ligación precisa de nucleótidos, los cuales están modificados o sin modificar, permitiendo la definición de un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no contiene nucleótidos no naturales, y pudiendo corresponder también con un ADN de doble hebra, un ADN de hebra simple como a los productos de transcripción de dichos ADNs.

Debe entenderse también en este punto que la presente invención no se ocupa de las secuencias nucleotídicas en su entorno cromosómico natural, es decir, en el estado natural. Se refiere a secuencias las cuales han sido aisladas y/o purificadas, es decir, han sido seleccionadas en forma directa o indirecta, por ejemplo por copia, habiendo sido su entorno por lo menos parcialmente modificado. Por lo tanto, igualmente se pretende indicar en este punto los ácidos nucleicos aislados obtenidos por recombinación genética por medio de, por ejemplo, células huéspedes u obtenidos por síntesis química.

Una hibridación bajo condiciones de elevada severidad significa que las condiciones de temperatura y las condiciones de resistencia iónica se seleccionan de modo tal que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementario. A modo de ilustración, las condiciones de elevada severidad del paso de hibridación para los propósitos de definir los fragmentos polinucleotídicos antes descritos son ventajosamente las siguientes.

La hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos pasos: (1) prehibridación a 42°C durante 3 horas en buffer de fosfato (20 mM, pH 7,5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una solución de NaCl 0.15 M + citrato sódico 0.015 M), 50% de formamida, 7% de dodecilsulfato sódico (SDS), 10 x Denhardt's, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación real durante 20 horas a una temperatura dependiente del tamaño de la sonda (es decir, 42°C, para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos) seguido por 2 lavados de 20 minutos a 20°C en 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 x SSC + 0,1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0,1 x SSC + 0,1% de SDS durante 30 minutos a 60°C para un tamaño de sonda de > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridación de elevada severidad antes descritas para un polinucleótido de tamaño definido pueden adaptarse por el experto en la técnica para oligonucleótidos de tamaño mayor o menor, de acuerdo con las enseñanzas de Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

La invención se refiere, asimismo, a un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La invención apunta especialmente a la clonación y/o expresión de vectores los cuales contienen una secuencia nucleotídica de acuerdo con la invención.

Los vectores de acuerdo con la invención preferentemente contienen elementos los cuales permiten la expresión y/o la secreción de las secuencias nucleotídicas traducidas en una células huésped determinada. Por lo tanto, el

vector debe contener un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, así como también regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Debe poder mantenerse en forma estable en la célula huésped y puede opcionalmente tener señales particulares las cuales especifican la secreción de la proteína traducida. Estos elementos diferentes son seleccionados y optimizados por el experto en la técnica en función de la célula huésped utilizada. Con este fin, las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención pueden insertarse en vectores de replicación autónomos en el huésped seleccionado, o pueden ser vectores integrativos del huésped seleccionado.

Ese tipo de vectores son preparados mediante métodos actualmente utilizados por el experto en la técnica, y los clones resultantes pueden ser introducidos en un huésped apropiado mediante métodos convencionales, tales como lipofección, electroporación, choque térmico, o métodos químicos.

Los vectores de acuerdo con la invención son, por ejemplo, vectores de origen plasmídico o viral. Son útiles para transformar células huéspedes a fin de clonar o expresar las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención.

Igualmente, la invención comprende las células huéspedes mediante o comprendiendo un vector de acuerdo con la invención. La célula huésped puede seleccionarse entre sistemas procarióticos o eucarióticos, por ejemplo, células bacterianas pero igualmente células de levadura o células animales, en particular células de mamífero. Es asimismo posible utilizar células de insecto o células vegetales.

Igualmente, la invención se refiere a animales, excepto el hombre, los cuales comprenden por lo menos una célula transformada de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otro aspecto, un objeto de la invención es un proceso para la producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) cultivo en un medio y condiciones de cultivo apropiadas de una célula huésped de acuerdo con la invención; y

b) la recuperación de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de ese modo comenzado del medio de cultivo o dichas células cultivadas.

Las células transformadas de acuerdo con la invención pueden utilizarse en procesos para la preparación de polipéptidos recombinantes de acuerdo con la invención. Los procesos para la preparación de un polipéptido de acuerdo con la

44

invención en forma recombinante, caracterizado porque emplean un vector y/o una célula transformada mediante un vector de acuerdo con la invención, son por sí mismos comprendidos en la presente invención. Preferentemente, una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención se cultiva bajo condiciones las cuales dan lugar a la expresión de dicho polipéptido y se recupera dicho péptido recombinante.

Según lo mencionado, la célula huésped puede seleccionarse entre sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención, facilitando la secreción en dicho sistema procariótico o eucariótico. Un vector de acuerdo con la invención que porta ese tipo de secuencia puede, por lo tanto, utilizarse ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes, destinadas a ser secretadas. En efecto, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés será facilitada por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular más que en el interior de las células huéspedes.

Es igualmente posible preparar los polipéptidos de acuerdo con la invención mediante síntesis química. Ese tipo de proceso de preparación es igualmente un objeto de la invención. El experto en la técnica conoce los procesos de síntesis química, por ejemplo las técnicas que emplean fases sólidas [Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2da ed., (1984)] o técnicas que utilizan fases sólidas parciales, por condensación de fragmentos o mediante una síntesis clásica en solución. Los polipéptidos obtenidos mediante síntesis química y que son capaces de contener aminoácidos no naturales correspondientes están igualmente comprendidos en la invención.

Los anticuerpos, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, capaces de ser obtenidos mediante un proceso de acuerdo con la invención están igualmente comprendidos en la presente invención.

La invención también se refiere al anticuerpo de la invención como un medicamento.

La invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica que comprende a modo de principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención, preferentemente mezclado con un excipiente y/o un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

Otra realización complementaria de la invención consiste en una composición tal como se describe con anterioridad la cual comprende,

45

adicionalmente, como un producto de combinación para el uso simultáneo, separado o consecutivo, un anticuerpo anti-tumoral.

Con máxima preferencia, dicho segundo anticuerpo anti-tumoral podría seleccionarse entre los anticuerpos anti-IGF-IR, anti-EGFR, anti-HER2/neu, anti-VEGFR, anti-VEGF, etc., o entre cualquiera de los otros anticuerpos antitumorales conocidos por el experto en la técnica. Es evidente que el uso, como segundo anticuerpo, de fragmentos funcionales o derivados de los anticuerpos antes mencionados es parte de la invención.

Como un anticuerpo más preferido, los anticuerpos anti-EGFR se seleccionan tal como por ejemplo el anticuerpo C225 (Erbix).

“Uso simultáneo” quiere decir la administración de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención en una forma farmacéutica única e idéntica.

“Uso por separado” se entiende que significa la administración, al mismo tiempo, de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención en formas farmacéuticas distintas.

“Uso consecutivo” se entiende que significa la administración sucesiva de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención, cada uno en una forma farmacéutica distinta.

En forma general, la composición de acuerdo con la invención aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento del cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-c-Met de acuerdo con la invención es potenciado en forma inesperada mediante la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja subsiguiente principal producida por una composición de acuerdo con la invención se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces inferiores de principio activo, lo cual permite evitar los riesgos de aparición de efectos secundarios o la reducción de los mismos, en particular los efectos del agente citotóxico.

Por añadidura, esta composición de acuerdo con la invención permitiría el logro del efecto terapéutico esperado de manera más rápida.

La composición de la invención también puede ser caracterizada porque comprende, adicionalmente, como un producto combinado para el uso simultáneo, separado o consecutivo, un agente citotóxico/ citostático.

Por “agentes terapéuticos anticancerígenos” o “agentes citotóxicos / citostáticos”, se quiere decir una sustancia la cual, cuando se administra a un sujeto, trata o previene el desarrollo de cáncer en el cuerpo del sujeto. Como un

ejemplo no limitativo de ese tipo de agentes, puede mencionarse agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores de la función de cromatina, agentes anti-angiogénesis, anti-estrógenos, anti-andrógenos o inmunomoduladores.

Dichos agentes son, por ejemplo, citados en la edición 2001 de VIDAL, en la página dedicada a los compuestos vinculados con la columna de cancerología y hematología "Citotóxicos", estos compuestos citotóxicos citados con referencia a este documento son citados aquí como agentes citotóxicos preferidos.

Más particularmente, los siguientes agentes son preferidos de acuerdo con la invención.

"Agente alquilante" se refiere a cualquier sustancia la cual puede entrecruzar o alquilar cualquier molécula, con preferencia, ácido nucleico (por ej., ADN), dentro de una célula. Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostaza de nitrógeno tal como mecloretamina, clorambucol, melfalen, cloridrato, pipobromen, prednimustina, fosfato disódico o estramustina; oxazoforinas tales como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida o ifosfamida; aziridinas o imina-etilenos tales como tiotepa, trietilenamina o altetramina; nitrosourea tales como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; alquilen-sulfonatos tales como busulfan, treosulfan o improsulfan; triacenos tales como dacarbazina; o complejos de platino tales como cis-platino, oxaliplatino y carboplatino.

"Anti-metabolitos" se refieren a sustancias que bloquean el crecimiento y/o el metabolismo celular interfiriendo con ciertas actividades, generalmente con la síntesis del ADN. Los ejemplos de anti-metabolitos incluyen metotrexato, 5-fluoruracilo, floxuridina, 5-fluorodesoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, arabinósido de citosina, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, desoxicoformicina y pentostatina.

"Antibióticos antitumorales" se refieren a compuestos los cuales pueden evitar o inhibir la síntesis del ADN, ARN y/o proteína. Los ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina, y procarbazona.

"Inhibidores mitóticos" previenen la evolución normal del ciclo celular y la mitosis. En general, los inhibidores microtubulares o taxoides tales como paclitaxel y docetaxel son capaces de inhibir la mitosis. Los alcaloides de la Vinca tales

47

como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina son también capaces de inhibir la mitosis.

"Inhibidores de la función de la cromatina" o "inhibidores de la topoisomerasa" se refieren a sustancias las cuales inhiben la función normal de las proteínas de modelado de la cromatina tales como topoisomerasa I o topoisomerasa II. Los ejemplos de los inhibidores de la función de la cromatina incluyen, para topoisomerasa I, camptotecina y sus derivados tales como topotecan o irinotecan, y, para la topoisomerasa II, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido.

"Agente anti-angiogénesis" se refiere a cualquier fármaco, compuesto, sustancia o agente el cual inhibe el crecimiento de los vasos sanguíneos. Los agentes antiangiogénesis ejemplares incluyen, aunque sin limitarse a, razoxina, marimastat, batimastat, prinomastat, tanomastat, ilomastat, CGS-27023A, halofuginon, COL-3, neovastat, BMS-275291, talidomida, CDC 501, DMXAA, L-651582, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, interferón-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina y vitaxin.

"Anti-estrógeno" o "agente anti-estrogénico" se refiere a cualquier sustancia la cual reduce, antagoniza o inhibe la acción de estrógeno. Los ejemplos de agentes antiestrogénicos son tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno, anastrozol, letrozol, y exemestano.

"Anti-andrógenos" o "agentes anti-andrógenos" se refiere a cualquier sustancia la cual reduce, antagoniza o inhibe la acción de un andrógeno. Los ejemplos de antiandrógenos son flutamida, nilutamida, bicalutamida, espironolactona, acetato de ciproterona, finasterida y cimitidina.

"Inmunomoduladores" son sustancias las cuales estimulan el sistema inmune.

Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen interferón, interleuquina tales como aldesleuquina, OCT-43, denileuquina diflitox y interleuquina-2, factores de necrosis tumoral tales como tasonermina u otros inmunomoduladores tales como lentinan, sizofiran, roquinimex, pidotimod, pegademase, timopentina, poli I:C o levamisol en conjunto con 5-fluorouracilo.

Para más detalle, el experto en la técnica podría hacer referencia al manual editado por the "Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique" y titulado "Traité de chimie thérapeutique", vol. 6, Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edición TEC & DOC, 2003.

Se pueden mencionar además como agentes químicos o agentes citotóxicos, todos los inhibidores de quinasa tales como, por ejemplo, gefitinib o erlotinib.

En una realización particularmente preferida, dicha composición como un producto de combinación de acuerdo con la invención es caracterizada porque dicho agente citotóxico es acoplado químicamente a dicho anticuerpo para uso simultáneo.

A fin de facilitar el acoplamiento entre dicho agente citotóxico y dicho anticuerpo de acuerdo con la invención, es especialmente posible introducir moléculas espaciadoras entre los dos compuestos que se van a acoplar, tales como poli(alquilen)glicoles tal como polietilenglicol, o sino aminoácidos, o, en otra realización, para utilizar derivados activos de dichos agentes citotóxicos en los cuales se habrían introducido funciones capaces de reaccionar con dicho anticuerpo de acuerdo con la invención. Estas técnicas de acoplamiento son bien conocidas por el experto en la técnica y no serán descritas con más detalle en la presente descripción.

La invención se refiere, en otro aspecto, a una composición caracterizada porque uno, por lo menos, de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales o derivados, se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.

Preferentemente, dicha toxina o dicho radioelemento es capaz de inhibir por lo menos una actividad celular de células que expresan el c-Met, en un modo más preferido capaz de prevenir el crecimiento o la proliferación de dicha célula, especialmente o totalmente inactivando dicha células.

Preferentemente también, dicha toxina es una toxina enterobacteriana, especialmente la exotoxina A de *Pseudomonas*.

Los radioelementos (o radioisótopos) preferentemente conjugados a los anticuerpos empleados para la terapia son radioisótopos los cuales emiten rayos gamma y preferentemente yodo¹³¹, itrio⁹⁰, oro¹⁹⁹, paladio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ y antimonio²¹¹. Los radioisótopos los cuales emiten rayos beta y alfa pueden igualmente utilizarse para la terapia.

Por toxina o radioelemento conjugado a por lo menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, se pretende indicar cualquier medio que permita a dicha toxina o dicho radioelemento unirse a dicho por lo menos un anticuerpo, especialmente mediante acoplamiento covalente entre los dos compuestos, con o sin introducción de una molécula de enlace.

Entre los agentes que permiten la unión en una forma química (covalente), electrostática o no covalente de la totalidad o parte de los componentes del conjugado, puede mencionarse particularmente a la benzoquinona, carbodiimida y más particularmente EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetil-aminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil S-acetil tio-acetato (SATA), los agentes puente que tienen uno o más grupos fenilazida que reaccionan con los ultravioletas (U.V.) y con preferencia N-[4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-succinimid-il 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

Otra forma de acoplamiento, especialmente para los radioelementos, puede consistir en el uso de un quelante iónico bifuncional.

Entre estos quelatos, es posible mencionar los quelatos derivados de EDTA (ácido etilendiaminatetraacético) o de DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético) los cuales han sido desarrollados para unir metales, especialmente metales radiactivos e inmunoglobulinas. Por ende, DTPA y sus derivados pueden ser sustituidos por diferentes grupos en la cadena de carbono a fin de aumentar la estabilidad y la rigidez del complejo de ligando-metal (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); Patente de los Estados Unidos No. 4.831.175).

Por ejemplo, el ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) y sus derivados, los cuales han sido ampliamente utilizados en medicina y en biología durante un largo tiempo ya sea en su forma libre, o en la forma de un complejo con un ión metálico, tienen la característica notable de formar quelatos estables con iones metálicos y de ser acoplados con proteínas de interés terapéutico o de diagnóstico tales como anticuerpos para el desarrollo de radioinmunoconjugados en terapia contra el cáncer (Meases et al., 1984; Gansow et al., 1990).

Asimismo, con preferencia, dicho por lo menos un anticuerpo que forma dicho conjugado de acuerdo con la invención se selecciona entre sus fragmentos funcionales, especialmente los fragmentos amputados de su componente de Fc tales como los fragmentos scFv.

Según lo ya mencionado, en una realización preferida de la invención, dicho agente citotóxico/ citostático o dicha toxina y/o un radioelemento es acoplado químicamente a por lo menos uno de los elementos de dicha composición para uso simultáneo.

La presente invención comprende la composición descrita como un medicamento.

La presente invención comprende además el uso de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, y/o de una composición según lo descrito anteriormente para la preparación de un medicamento destinado a inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales.

Otro aspecto de la invención consiste en el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales y/o de una composición, según lo descrito anteriormente o el uso antes mencionado, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento del cáncer.

La presente invención también comprende un método destinado a inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales en un paciente que comprende la administración a un paciente que lo necesita de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos o derivados funcionales de acuerdo con la invención, un anticuerpo producido por un hibridoma de acuerdo con la invención o una composición de acuerdo con la invención.

La presente invención comprende además un método para la prevención o el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende la administración al paciente de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos o derivados funcionales de acuerdo con la invención, un anticuerpo producido por un hibridoma de acuerdo con la invención o una composición de acuerdo con la invención.

En un aspecto preferido en particular, dicho cáncer es un cáncer seleccionado entre cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de endometrio, glioblastoma o cáncer de colon.

Según lo ejemplificado anteriormente, una ventaja de la invención consiste en el tratamiento de la activación de Met dependiente o independiente de HGF relacionada con cánceres.

La invención, en aun otro aspecto, abarca un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una expresión insuficiente del receptor c-Met comenzando a partir de una muestra biológica en la cual la presencia anormal del receptor c-Met es sospechada, estando dicho método caracterizado porque comprende un paso donde dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo de la invención, siendo posible que dicho anticuerpo sea etiquetado en caso de ser necesario.

51

Preferentemente, dichas enfermedades conectadas con una presencia anormal del receptor c-Met en dicho método de diagnóstico serán cánceres. Dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, puede estar presente en la forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo etiquetado de modo de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Los anticuerpos etiquetados de acuerdo con la invención o sus fragmentos funcionales incluyen, por ejemplo, anticuerpos denominados inmunoconjugados los cuales pueden ser conjugados, por ejemplo, con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o mediante una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromodesoxiuridina. Las etiquetas fluorescentes pueden asimismo conjugarse a los anticuerpos o a sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención y especialmente incluyen fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, GFP (GFP por "Green Fluorescent Protein" (Proteína Fluorescente Verde), dansilo, umbeliferona etc. En ese tipo de conjugados, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos funcionales pueden prepararse mediante métodos conocidos por el experto en la técnica. Pueden acoplarse a las enzimas o a las etiquetas fluorescentes directamente o mediante el intermediario o un grupo espaciador o de un grupo de ligación tal como un polialdehído, tal como glutaraldehído, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilen-triaminapentaacético (DTPA), o en presencia de agentes de acoplamiento tales como aquellos antes mencionados para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que contienen etiquetas de tipo fluoresceína pueden prepararse mediante reacción con un isotiocianato.

Otros conjugados pueden incluir, asimismo, etiquetas quimiluminiscentes tales como luminol y los dioxetanos, etiquetas bio-luminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o sino etiquetas radiactivas tales como yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹²⁶, yodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, flúor¹⁸, itrio¹⁹⁹, yodo¹³¹. Los métodos conocidos por el experto en la técnica existentes para acoplar los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos ya sea directamente o por medio de un agente quelante tales como EDTA, DTPA mencionados anteriormente pueden utilizarse para los radioelementos los cuales pueden utilizarse en diagnóstico. Igualmente, es posible mencionar el marcado con Na[I¹²⁵]

52

mediante el método de cloramina T [Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] o sino con tecnecio^{99m} mediante la técnica de Crockford *et al.* (Patente de los Estados Unidos No. 4.424.200) o unido por medio de DTPA según lo descrito por Hnatowich (Patente de los Estados Unidos No. 4.479.930).

Por lo tanto, el anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención puede emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una expresión insuficiente, preferentemente una sobreexpresión, del receptor c-Met en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) el poner en contacto a la muestra biológica con un anticuerpo, o con su fragmento o derivado funcional, de acuerdo con la invención; y
- b) la demostración del complejo de c-Met/anticuerpo posiblemente formado.

En una realización en particular, el anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención, puede emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación del receptor c-Met en una muestra biológica, para el monitoreo de la eficacia de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer dependiente de c-Met.

Más generalmente, el anticuerpo o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención puede emplearse ventajosamente en cualquier situación donde la expresión del receptor c-Met debe ser observada en forma cualitativa y/o cuantitativa.

Con preferencia, la muestra biológica es formada mediante un fluido biológico, tal como suero, sangre entera, células, una muestra de tejido o biopsias de origen humano.

Puede emplearse cualquier procedimiento o ensayo convencional a fin de llevar a cabo ese tipo de detección y/o dosificación. Dicho ensayo puede ser un ensayo de competición o sándwich, o cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica dependiente de la formación de un complejo inmune de tipo anticuerpo-antígeno. Luego de las aplicaciones de acuerdo con la invención, el anticuerpo o un fragmento o derivado funcional del mismo puede ser inmovilizado o marcado. Esta inmovilización puede llevarse a cabo en numerosos soportes conocidos por el expertos en la técnica. Estos soportes pueden incluir, especialmente, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, o células naturales o modificadas. Estos soportes pueden ser solubles o insolubles.

57

A modo de ejemplo, un método preferido implica procesos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA, por inmunofluorescencia, o técnica de radio-inmunoensayo (RIA) o equivalente.

Por lo tanto, la presente invención comprende igualmente los kits o conjuntos necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una expresión insuficiente del receptor c-Met o para llevar a cabo un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una expresión insuficiente del receptor c-Met en una muestra biológica, con preferencia, una sobreexpresión de dicho receptor, caracterizado porque dicho kit o conjunto comprende los siguientes elementos:

- a) un anticuerpo, o un fragmento o derivado funcional del mismo, de acuerdo con la invención;
- b) opcionalmente, los reactivos para la formación del medio favorables para la reacción inmunológica;
- c) opcionalmente, los reactivos que permiten la demostración de complejos de c-Met/anticuerpo producidos mediante la reacción inmunológica.

Un objetivo de la invención es asimismo el uso de un anticuerpo o una composición de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento destinado al direccionamiento específico de un compuesto biológicamente activo hacia células que expresan o que sobreexpresan el receptor c-Met.

Se quiere decir en la presente por compuesto biológicamente activo cualquier compuesto capaz de modular, especialmente de inhibir, la actividad celular, en particular su crecimiento, su proliferación, transcripción o traducción genética.

Un objetivo de la invención es además un reactivo de diagnóstico *in vivo* que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, o un fragmento o derivado funcional del mismo, con preferencia marcado, especialmente radioetiquetado, y su uso en la obtención de imágenes médicas, en particular para la detección del cáncer en conexión con la expresión o la sobreexpresión por una célula del receptor c-Met.

La invención se refiere igualmente a una composición como un producto combinado o a un conjugado anti-c-Met/toxina o radioelemento, de acuerdo con la invención, como un medicamento.

Preferentemente, dicha composición como un producto combinado o dicho conjugado de acuerdo con la invención se mezclará con un excipiente y/o un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

En la presente descripción, vehículo aceptable para uso farmacéutico tiene el propósito de indicar un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica sin provocar reacciones secundarias y el cual permite, por ejemplo, la facilitación de la administración del o de los compuestos activos, un aumento en su vida útil y/o en su eficacia en el cuerpo, un aumento de su solubilidad en solución o sino una mejora en su conservación. Estos vehículos aceptables para uso farmacéutico son bien conocidos y serán adaptados por el experto en la técnica en función de la naturaleza y del modo de administración del compuesto o de los compuestos activos seleccionados.

Con preferencia, estos compuestos serán administrados por la ruta sistémica, en particular mediante la ruta intravenosa, por la ruta intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por la ruta oral. En una forma más preferida, la composición que comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención será administrada varias veces, en forma consecutiva.

Sus modos de administración, dosificaciones y formas farmacéuticas óptimas pueden determinarse de acuerdo con los criterios generalmente tomados en cuenta en el establecimiento de un tratamiento adaptado a un paciente tal como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la seriedad de su condición general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios observados.

Otras características y ventajas de la invención aparecen a continuación de la descripción con los ejemplos y las figuras donde:

Figura 1: Efecto de Mabs de IgG1 irrelevantes de origen murino y humano y PBS sobre la fosforilación del receptor c-Met sobre células A549.

Figuras 2A y 2B: Efecto de Mabs 224G11 murinos y humanizados producidos como un isotipo humano de IgG1/kappa sobre la fosforilación del receptor c-Met sobre las células A549.

Figura 2A: efecto agonista calculado como porcentaje versus estimulación máxima de la fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figura 2B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figuras 3A y 3B: Comparación entre Mab 224G11 murino y Mabs 224G11 quiméricos que contienen diversas regiones bisagra modificadas por ingeniería

genética, sobre la fosforilación del receptor c-Met sobre las células A549.

Figura 3A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 3B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figuras 4A y 4B: Comparación entre Mab 224G11 murino y Mabs 224G11 quiméricos y humanizados producidos como un isotipo de IgG2/kappa humano, sobre la fosforilación del receptor c-Met en células A549.

Figura 4A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 4B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figuras 5A y 5B: Comparación entre Mab 224G11 murino y Mabs 224G11 quiméricos y humanizados producidos como un mutante bisagra modificado por ingeniería genética TH7IgG1/kappa, sobre la fosforilación del receptor c-Met en células A549.

Figura 5A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 5B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figuras 6A y 6B, Figuras 7A y 7B, Figuras 8A y 8B, Figuras 9A y 9B, Figuras 10A y 10B: modelos de BRET con Figuras A: modelo de dimerización de c-Met; y Figuras B: modelo de activación de c-Met.

Figura 11: reconocimiento de c-Met mediante formas de 224G11 quiméricas y humanizadas.

Figura 12: Efecto de anticuerpos murinos y quiméricos sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*. Las células NCI-H441 fueron plaqueadas en medio libre de suero. 24 horas después de colocación en placas, se agregaron m224G11 y [224G11]quim ya sea en ausencia o en presencia de HGF. Las flechas negras indican los pocillos plaqueados con células solas ya sea en ausencia  o en presencia  de HGF. Una IgG1 murina (mIgG1) se introdujo como un control de isotipo.

Figura 13: Comparación *in vivo* de Mabs de 224G11 quiméricos de IgG1 y murinos en el modelo de xenoinjerto de NCI-H441.

Figuras 14A y 14B: Efecto el Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo sobre la proliferación inducida por

HGF de células NCI-H441 in vitro. Las células NCI-H441 se colocaron en placas en medio libre de suero. 24 Horas después de colocación en placa, los anticuerpos que se van a analizar se agregaron ya sea en ausencia o en presencia de HGF. En el panel (Figura 14A), Las versiones m224G11 murino, IgG1 quimérica [224G11]quim, IgG1 humanizada [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3] se mostraron. En el panel (Figura 14B), se presentaron las formas de m224G11 murino y diversas formas de IgG1 quiméricas ([224G11] quim, [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim]). Las flechas negras indican los pocillos plaqueados con células solas ya sea en ausencia  o en presencia  de HGF. Se introdujo una IgG1 murina como un control negativo para la actividad agonista. El m5D5 se utilizó como un control agonista completo dosis-dependiente.

Figura 15: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 in vitro. Las células NCI-H441 se plaquearon en medio libre de suero. 24 Horas después de la colocación en placas, los anticuerpos que se van a analizar se agregaron ya sea en ausencia o en presencia de HGF. Se presentaron las formas m224G11 murina, [224G11] quim, [224G11] [TH7 quim]) IgG1 quiméricas y [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]). Las flechas negras indican los pocillos con células solas ya sea en ausencia  o en presencia  de HGF. Se introdujo una IgG1 murina como un control negativo para la actividad agonista. Se utilizó el m5D5 como un control agonista completo dependiente de la dosis.

Figura 16: Comparación *in vivo* de Mabs 224G11 murinos, quiméricos y humanizados en el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

Figura 17A: efecto agonista calculado como porcentaje contra la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 17B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met mediante HGF [100 ng/ml].

Figura 18: Modelos de BRET con modelo de activación de c-Met.

Figura 19: Efecto de m224G11 y h224G11 sobre la degradación de c-Met en células A549. A) Media de 4 experimentos independientes +/- s.e.m. B) Imagen de western blot representativa de los 4 experimentos independientes realizados.

Figura 20: Efecto de m224G11 y h224G11 sobre la degradación de c-Met en células NCI-H441. A) Media de 4 experimentos independientes +/- s.e.m. B) Imagen de Western blot representativa de los 4 experimentos independientes

A

realizados.

Figura 21: Configuración de un ELISA para evaluar la eliminación de c-Met.

Figura 22: Evaluación *in vitro* de eliminación de c-Met en células NCI-H441 tratadas durante 5 días con m224G11. mlgG1 es un anticuerpo irrelevante utilizado como un control de isotipo.

Figura 23: Evaluación *in vitro* de eliminación de c-Met en líneas celulares Hs746T, MKN45 y EBC-1 amplificadas tratadas durante 5 días con m224G11. mlgG1 es un anticuerpo irrelevante utilizado como un control de isotipo. PMA es un inductor de eliminación utilizado como un control positivo.

Figura 24: Evaluación *in vitro* de eliminación de c-Met en NCI-H441 y líneas celulares Hs746T, MKN45 y EBC-1 amplificadas tratadas durante 5 días con m224G11. mlgG1 es un anticuerpo irrelevante utilizado como un control de isotipo. PMA es un inductor de la eliminación utilizado como un control positivo.

Figura 25: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular Hs746T.

Figura 26: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular NCI-H441. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figura 27: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular Hs578T. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figura 28: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular NCI-H125. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figura 29: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular T98G. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figura 30: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular MDA-MB-231. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figura 31: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en línea celular PC3. A) fosfo-ELISA y B) análisis Western.

Figura 32: Estudio de fosforilación intrínseca de h224G11 en células HUVEC.

Figura 33: Comparación *in vivo* del anticuerpo 224G11 murino de tipo salvaje con Mabs del 224G11 quimérico con modificación en la región bisagra [C2D5-7] en el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

Figura 34: Inducción ADCC por h224G11 en células Hs746T y NCI-H441. Se mezclaron células Hs746T marcadas con ^{51}Cr (A) o NCI-H441 (B) cargadas (cuadrados llenos) o no (cuadrados vacíos) con h224G11 con relación diferente de células NK humanas y se incubaron durante 4 horas. Se cosecharon las células y

se realizó el recuento de cpm de ^{51}Cr liberado por lisis. Los resultados se representaron como la lisis porcentual frente a la relación de efector/células objetivo. NL corresponde a las células sin carga.

Figura 35: Tinción con h224G11 en xenoinjerto tumoral que expresó diversos niveles de c-Met (A : línea celular amplificada Hs746T para c-Met, B : alto nivel de expresión c-Met en NCI-H441 y C : bajo nivel de c-Met en MCF-7).

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos contra c-Met

Para generar anticuerpos anti-c-Met se inmunizaron ratones BALB/c de 8 semanas de edad ya sea 3 a 5 veces subcutáneamente con una línea celular transfectada CHO que expresa c-Met en su membrana plasmática (20×10^6 células/dosis/ratón) o 2 a 3 veces con una proteína de fusión de dominio extracelular de c-Met (10-15 μg /dosis/ratón) (R&D Systems, Catálogo # 358MT) o fragmentos de esta proteína recombinante mezclada con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund para las siguientes. Los protocolos mixtos en los cuales los ratones recibieron tanto células CHO-cMet como proteínas recombinantes también se llevaron a cabo. Tres días antes de la fusión celular, los ratones fueron estimulados i.p. o i.v. con la proteína recombinante o fragmentos. Luego, los bazos de ratones se recolectaron y fusionaron a células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC) y se sometieron a selección de HAT. Se llevaron a cabo cuatro fusiones. En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible hacer referencia a técnicas las cuales son descritas en particular en el manual "Anticuerpos" (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) o a la técnica de preparación de hibridomas descrita por Kohler y Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Los hibridomas obtenidos fueron inicialmente cribados por ELISA sobre la proteína recombinante de c-Met y luego mediante análisis FACS en líneas celulares A549 NSCLC, BxPC3 pancreática, y U87-MG glioblastoma para asegurarse de que los anticuerpos producidos serán capaces de reconocer también al receptor nativo en células tumorales. Los reactores positivos en estos 2 ensayos fueron amplificados, clonados y un conjunto de hibridomas fue recuperado, purificado y cribado para determinar su capacidad de inhibir la proliferación celular *in vitro* en el modelo BxPC3.

Para ese propósito 50.000 células BxPC3 se colocaron en placas de 96

pocillos en medio RPMI, 2 mM L. Glutamina, sin SVF. 24 Horas después de colocación en placas, los anticuerpos que se van a analizar se agregaron a una concentración final que oscilaba entre 0,0097 y 40 µg/ml 60 min antes de la adición de 100 ng/ml de hHGF. Después de 3 días, las células fueron pulsadas con 0,5 µCi de [³H]timidina durante 16 horas. La magnitud de [³H]timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó mediante recuento por centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como datos sin elaborar para realmente evaluar el efecto agonista intrínseco de cada Mab.

Luego, los anticuerpos que inhiben por lo menos 50% de proliferación celular se evaluaron para determinar su actividad en la dimerización de c-Met y análisis de BRET de activación en células transfectadas. La actividad del receptor c-Met se cuantificó midiendo el reclutamiento de moléculas de señalización de Gab1 en c-Met activado. Para ese propósito, se generaron líneas celulares estables CHO que expresan C-Met-Rluc o C-Met-Rluc y C-Met-K1100A-YFP para la dimerización de c-Met o C-Met-Rluc y una forma mutada de Gab1 [Maroun et al., Mol. Cell. Biol., 1999, 19:1784-1799] fusionada a YFP para la activación de c-Met. Las células fueron distribuidas en microplacas de 96 pocillos blancas en DMEM-F12/FBS 5% de medio de cultivo uno o dos días antes de los experimentos de BRET. Las células fueron cultivadas, en primer lugar, a 37°C con CO₂ 5% a fin de permitir la unión celular a la placa. Luego, las células se matan de hambre con 200 µl de DMEM/pocillo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento, DMEM se eliminó y las células se lavaron rápidamente con PBS. Las células se incubaron en PBS en presencia o ausencia de anticuerpos a ser analizados o compuestos de referencia, 10 min a 37°C con anterioridad a la adición de coelenterazina con o sin HGF en un volumen final de 50 µl. Después de la incubación durante otros 10 minutos a 37°C, se inició la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm utilizando el luminómetro Mithras (Berthold) (1s/longitud de onda / pocillo repetido 15 veces).

La relación de BRET ha sido definida previamente [Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689] como: [(emisión a 530 nm) - (emisión a 485 nm) X Cf] / (emisión a 485 nm), donde Cf corresponde a (emisión a 530 nm) / (emisión a 485 nm) para células que expresan proteína de fusión Rluc solamente en las mismas condiciones experimentales. La simplificación de esta ecuación muestra que la relación de BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando los dos socios estaban presentes, corregido por la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solamente el socio

fusionado a *R. reniformis* luciferasa estaba presente en el ensayo. Por cuestiones de legibilidad, los resultados son expresados en unidades miliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación de BRET multiplicada por 1000.

Después de este segundo ensayo *in vitro*, se seleccionó el anticuerpo 224G11 i) sin actividad intrínseca como una molécula entera en el ensayo funcional de proliferación, ii) inhibiendo significativamente la proliferación de BxPC3 y iii) inhibiendo la dimerización de c-Met. En los experimentos, el Mab 5D5, generado por Genentech, y disponible en la ATCC, se agregó como un control para la actividad agonista intrínseca.

Ejemplo 2: Proceso de humanización de Mab 224G11 de ratón por injerto de CDR

1°) Humanización del dominio variable (VL) de cadena ligera

Como un paso preliminar, la secuencia nucleotídica de 224G11 VL se comparó con las secuencias genéticas de línea germinal murinas incluidas en la base de datos de IMGT (<http://imgt.cines.fr>). Los genes de línea germinal murinos IGKV3-5*01 y IGKJ4*01 que muestran una identidad de secuencia de 99,31 % para la región V y 94,28% para la región J, respectivamente, han sido identificados. Considerando estas homologías elevadas, la secuencia nucleotídica 224G11VL ha sido utilizada directamente para buscar homologías humanas, en lugar de líneas germinales de ratón correspondientes.

En un segundo paso, el gen de línea germinal humano que exhibe la mejor identidad con el 224G11VL ha sido buscado para identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR (CDR grafting). Para la optimización de la selección, se han llevado a cabo alineaciones entre las secuencias de aminoácidos. El gen de línea germinal humano IGKV4-1*01 produjo una identidad de secuencia de 67,30%, pero mostró una longitud diferente para CDR1 (10 aminoácidos en 224G11 VL y 12 aminoácidos en IGKV4-1*01). Para la región J, se seleccionó el gen de línea germinal humano IGKJ4*02 (identidad de secuencia de 77,14%).

En un paso siguiente, las regiones de CDR de 224G11 VL de ratón se injertaron en las secuencias estructurales humanas seleccionadas anteriormente. Se analizó cada posición de aminoácido para diversos criterios tales como participación en la interfase VH/VL, en la unión al antígeno o en la estructura de CDR, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, anclajes de CDR, residuos pertenecientes a la zona Vernier. Se construyeron tres versiones

humanizadas, correspondientes a SEC ID No. 8, SEC ID No. 9 y SEC ID No. 10, y que contenían respectivamente cuatro (4, 39, 40, 84), dos (39, 40) o un (40) residuos murinos en sus regiones FR y las CDRs correspondientes a 224G11 VL de ratón.

2°) Humanización del dominio variable de cadena pesada (VH)

Como un paso preliminar, la secuencia nucleotídica del 224G11 VH se comparó con las secuencias de genes de línea germinal murinas incluidas en la base de datos de IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes murinos de líneas germinales IGHV1-18*01, IGHD2-4*01 y IGHJ2*01 con una identidad de secuencia de 92,70% para la región V, 75,00% para la región D y 89,36% para la región J, respectivamente, han sido identificados. Conforme a estas homologías elevadas, se ha decidido utilizar directamente las secuencias nucleotídicas 224G11VH para buscar homologías humanas, en lugar de líneas germinales de ratón correspondientes.

En un segundo paso, el gen de línea germinal humano que exhibe la mejor identidad con el 224G11 VH ha sido investigado para identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR. Con este propósito, la secuencia nucleotídica de 224G11 VH ha sido alineada con las secuencias de genes de líneas germinales humanas pertenecientes a la base de datos de IMGT. La secuencia humana IGHV1-2*02 V exhibió una identidad de secuencia de 75.00% en el nivel nucleotídico y 64,30% en el nivel de aminoácidos. Buscando homologías para la región H se ha arribado a la identificación del gen de línea germinal IGHJ4*04 humano con una identidad de secuencia de 78,72%.

En un siguiente paso, se injertaron regiones de CDR de 224G11 VH de ratón en las secuencias estructurales humanas antes seleccionadas. Se analizó cada posición de aminoácido para diversos criterios tales como la participación en la interfase VH/VL, en la unión al antígeno o en la estructura de CDR, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, anclajes de CDR, residuos pertenecientes a la zona Vernier. Se construyó una forma completamente humanizada, correspondiente a SEC ID 4; contiene residuos exclusivamente humanos en su regiones FR y las CDRs correspondientes a 224G11 VH de ratón.

Ejemplo 3: Construcción de mutantes bisagra mejorados

Es bien sabido por el experto en la técnica que la región bisagra participa fuertemente en la flexibilidad del dominio variable de inmunoglobulinas (véase Brekke et al., 1995; Roux et al., 1997). Durante el proceso de quimerización de

Mab 224G11, el dominio constante murino IGHG1 fue reemplazado por la porción IGHG1 equivalente de origen humano. Puesto que las secuencias de aminoácidos de la región bisagra eran altamente divergentes, la "murinización" de la región bisagra se llevó a cabo a fin de mantener su longitud y rigidez. Puesto que la región bisagra IGHG2 humana corresponde al homólogo más cercano de la bisagra IGHG1 murina, esta secuencia también fue considerada. Una serie de 7 secuencias bisagra diferentes fueron construidas (SEC ID Nos. 22 a 28) mediante la incorporación de porciones de las bisagras IGHG1 de ratón y la bisagra IGHG2 humana en la porción bisagra IGHG1 humana.

Otra serie de mutantes bisagra fue diseñada y construida (SEC ID Nos. 58 a 72) para evaluar la influencia de una cisteína adicional y su posición a lo largo del dominio bisagra, la delección de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos a lo largo del dominio bisagra y una combinación de estos dos parámetros (adición de cisteína y delección de aminoácidos).

Ejemplo 4: Producción de Mab 224G11 humanizado y formatos de Mab bisagra construidos genéticamente

Todas las formas de Mab antes descritas que contenían regiones bisagra quiméricas, humanizadas y/o construidas genéticamente fueron producidas luego de la transfección transitoria y utilizando el sistema HEK293/EBNA con un vector de expresión pCEP4 (InVitrogen, US).

Las secuencias nucleotídicas enteras correspondientes a las versiones humanizadas del dominio variable de las cadenas ligera (SEC ID No. 18, SEC ID No. 19 y SEC ID No. 20) y pesada (SEC ID No. 14) de Mab 224G11 se sintetizaron mediante síntesis genética global (Genecust, Luxemburgo). Se subclonaron en un vector pCEP4 (InVitrogen, US) portando la secuencia codificante entera del dominio constante [CH1-Bisagra-CH2-CH3] de una inmunoglobulina IgG1 o IgG2 humana. La modificación de la región bisagra se llevó a cabo intercambiando un fragmento de restricción {*Nhe1*-*Bcl1*} por la porción equivalente que porta las modificaciones deseadas, siendo sintetizado cada fragmento {*Nhe1*-*Bcl1*} respectivo mediante síntesis genética global (Genecust, LU). Todos los pasos de clonación se llevaron a cabo de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales según lo descrito en el manual de Laboratorio (Sambrook y Russel, 2001) o de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada constructo genético fue completamente validado por secuenciamiento de nucleótidos utilizando el kit de secuenciamiento de ciclo

terminador Big Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, US) y analizado utilizando un Analizador Genético 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US).

Las células HEK293 EBNA adaptadas en suspensión (Invitrogen, US) se cultivaron rutinariamente en frascos de 250 ml en 50 ml de medio libre de suero Excell 293 (SAFC Biosciences) suplementado con glutamina 6 mM en un agitador orbital (velocidad de rotación 110 rpm). La transfección transitoria se llevó a cabo con $2 \cdot 10^6$ células/ml utilizando polietilenimina de 25 kDa lineal (PEI) (Polysciences) preparada en agua a una concentración final de 1 mg/ml de ADN mixto y plásmido (concentración final de 1,25 µg/ml para relación de plásmido de cadena pesada a ligera de 1:1). A las 4 horas post-transfección, el cultivo se diluyó con un volumen de medio de cultivo fresco para lograr una densidad celular final de 10^6 células/ml. El proceso de cultivo se monitoreó sobre la base de la viabilidad celular y producción de Mab. Típicamente, los cultivos se mantuvieron durante 4 a 5 días. Los Mabs se purificaron utilizando un método de cromatografía convencional en una resina de Proteína A (GE Healthcare, US).

Todas las formas diferentes de Mabs fueron producidas en niveles adecuados con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad fueron producidos a niveles adecuados con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad oscilan típicamente entre 15 y 30 mg/l de Mabs purificados.

Ejemplo 5: Evaluación de estado de fosforilación de c-Met mediante ensayo ELISA específico para Fosfo-c-Met

Este ensayo funcional permite controlar la modulación del estado de fosforilación de c-Met ya sea por Mabs solos o en la presencia conjunta de HGF.

Se sembraron células A549 en una placa de 12MW en medio de crecimiento completo [F12K + 10 % FCS]. Las células se sometieron a inanición durante 16 horas antes de la estimulación con HGF [100 ng/ml], y cada Mab que se va a analizar se agregó en su concentración final de 30 µg/ml 15 minutos antes de la estimulación del ligando. Se agregó buffer de lisis enfriado con hielo 15 minutos después de la adición de HGF para detener la reacción de fosforilación. Las células se rasparon mecánicamente y los lisados celulares se recolectaron por centrifugación a 13000 rpm durante 10 min. a 4°C y corresponden a la fase de sobrenadante. El contenido proteico se cuantificó utilizando un kit BCA (Pierce) y se almacenó a -20°C hasta su utilización. El estado de fosforilación de c-Met se cuantificó por ELISA. Se utilizó un Mab anti-c-Met de cabra (R&D, ref AF276)

como un anticuerpo de captura (recubrimiento durante toda la noche a 4°C) y después un paso de saturación con un buffer de 5% de TBS-BSA (1 hora a temperatura ambiente (TA)), se agregaron 25 µg de lisados proteicos a cada pocillo de la placa de 96 MW recubierta. Después de una incubación de 90 minutos a TA, las placas se lavaron cuatro veces y se agregó el anticuerpo de detección (Mab anti-fosfo-c-Met, dirigido contra los residuos Tyr fosforilados en posición 1230, 1234 y 1235). Después de una incubación adicional de 1 hora y 4 lavados, se agregó un anticuerpo anti-conejo acoplado a HRP (Biosource) durante 1 hora a TA, y se llevó a cabo la detección por luminiscencia agregando Luminol. Las lecturas de luminiscencia eran en un lector de placas multimodo Mithras LB920 (Berthold).

Tanto el nivel basal como el nivel de fosforilación del receptor c-Met inducido por HGF [100 ng/ml] no se vieron afectados ni por el tratamiento con PBS, ni por la adición de Mabs murinos o humanos los cuales no se dirigen contra el receptor c-Met humano (Figura 1). Por otro lado, el Mab murino (m) 224G11 inhibió fuertemente la fosforilación de c-Met inducida por HGF [100 ng/ml] (Figura 2B) sin alterar por si mismo la fosforilación del receptor (Figura 2A). Sorprendentemente, la forma quimérica de Mab 224G11 (224G11quim/IgG1), lo que significa dominio variable (VH+VL) de m224G11 combinado con dominio constante humano IgG1/kappa proporcionó actividad agonista fuerte (17% del efecto máximo de HGF, Figura 2A) asociada con una eficacia antagonista reducida (54% de inhibición del efecto máximo de HGF comparado con el m224G11 que produce 75% de inhibición del efecto máximo de HGF, Figura 2B). Tres formas humanizadas de Mab 224G11, [224G11]Hz1/IgG1, [224G11]Hz2/IgG1 y [224G11]Hz3/IgG1, también construidas en una estructura humana IgG1/kappa, produjeron también una disminución de la eficacia antagonista y actividad agonista significativa (11 a 24% del nivel de HGF máximo) en comparación con 224G11 murino (Figuras 2A y 2B). Se construyó una serie de versiones modificadas genéticamente del dominio bisagra de cadena pesada y se analizaron en el ensayo de fosforilación del receptor c-Met. Como se muestra en la Figura 3A, se observó una importante reducción del efecto agonista asociada con el isotipo de hlgG1/kappa tanto para el constructo basado en IgG2 como para los constructos de IgG1/kappa modificados genéticamente [MH, MUP9H y TH7]. También se obtuvo un aumento concomitante de la eficacia antagonista. El mutante bisagra TH7 basado en hlgG1/kappa, con la secuencia más humana, se seleccionó para completar el proceso de humanización. En un paso siguiente, se generaron tres

versiones humanizadas de dominio variable de Mab 224G11 mediante combinación con ya sea un IgG2/kappa humano o un dominio constante bisagra construido genéticamente de TH7 basado en IgG1/kappa. Para los constructos humanizados de hlgG2/kappa, la versión humanizada Hz3 produjo un fuerte agonismo (Figura 4A), y para las tres versiones humanizadas, la eficacia antagonista estaba por debajo de aquella observada con Mab 224G11 murino y comparable con Mab basado en hlgG1 quimérico (56-57% de inhibición de efecto de HGF, Figura 4B). Por otro lado, la combinación de las tres versiones humanizadas Hz1, Hz2 o Hz3 con el mutante IgG1/TH7 construido por ingeniería genética casi restauró por completo las propiedades del Mab murino 224G11 en términos de actividad agonista débil (5-6% de efecto de HGF) y actividad antagonista fuerte (68 a 72% de inhibición del efecto de HGF) de la fosforilación del receptor c-Met (Figuras 5A y 5B). Estas variantes fueron altamente mejoradas en comparación con Mab 224G11 basado en IgG1 quimérico pero también con las formas humanizadas basadas en IgG2.

Una segunda serie de versiones construidas por ingeniería genética del dominio bisagra de cadena pesada se construyó y analizó en el ensayo de fosforilación de receptor c-Met. Como se muestra en la Figura 17A, todas esas versiones nuevas (c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6], c224G11[C9Δ2-7] y c224G11[Δ5-6-7-8]) exhibieron efecto agonista más débil que c224G11 puesto que sus actividades agonistas están comprendidas entre el 6 y el 14% del efecto de HGF comparado con 23% para c224G11. Como c224G11[TH7], todas esas nuevas versiones exhibieron un aumento concomitante en la eficacia antagonista [Figura 17B]. Dichos resultados mostraron que la construcción por ingeniería genética del dominio de cadena pesada por mutación puntual y/o delección podría modificar las propiedades agonistas/ antagonistas de un anticuerpo.

Ejemplo 6: análisis de BRET

En un primer grupo de experimentos, se había controlado que IgG1 murino, IgG1 humano e IgG2 humano irrelevantes no tuvieron efecto alguno de señal de BRET inducida por HGF en ambos modelos de BRET (experimento representativo

de 12 experimentos independientes; Figura 6). Estos Mabs son mencionados como controles.

Se evaluó el efecto de una forma quimérica de IgG1 de Mab 224G11 de ratón ([224G11]quim) tanto en el modelo BRET de dimerización de c-Met como de activación de c-Met. Si bien el Mab 224G11 de ratón inhibió 59,4% de la señal de BRET inducida por HGF en el modelo de dimerización de c-Met, el Mab [224G11]quim inhibió solamente 28,9% (Figura 7A). El anticuerpo [224G11]quim también era menos eficaz en la inhibición de la activación de c-Met inducida por HGF puesto que los anticuerpos [224G11]quim y m224G11 inhibieron respectivamente 34,5% y 56,4% de la señal de BRET inducida por HGF (Figura 7B). Por añadidura, m224G11 solo no tuvo efecto alguno sobre la activación de c-Met mientras que [224G11]quim tuvo un efecto agonista parcial sobre la activación de c-Met correspondiente a 32,9% de la señal inducida por HGF. Este efecto agonista parcial del [224G11]quim también fue observado en el modelo BRET de dimerización de c-Met puesto que [224G11]quim solo indujo un aumento de BRET correspondiente a 46,6% de la señal inducida por HGF contra 21,3% para m224G11 (Figura 7A).

En las Figuras 8A y 8B, las formas quiméricas mutadas bisagra de anticuerpo 224G11 mostraron un efecto inhibitor mayor sobre la señal de BRET inducida por HGF que [224G11]quim puesto que mostraron una inhibición del 59,7%, 64,4%, 53,2% y 73,8% de la señal de BRET de activación inducida por HGF (Figura 8B) y 61,8%, 64,4%, 52,5% y 64,4% de inhibición de la señal de BRET de dimerización de c-Met inducida por HGF (Figura 8A) para [224G11][MH quim], [224G11][MUP9H quim], [224G11][MMCH quim] y [224G11][TH7 quim] respectivamente. En contrario a [224G11]quim, el cual tuvo un efecto agonista parcial sobre la activación de c-Met, las formas quiméricas mutadas bisagra del anticuerpo 224G11 no mostraron un efecto significativo sobre la activación de c-Met solamente (5,1%, 7,6%, -2,0% y -6,9% respectivamente) según lo observado para m224G11.

En la Figura 9B, al igual que el [224G11] [TH7 quim], las 3 versiones humanizadas de anticuerpo de IgG1 224G11 con la bisagra TH7 no indujeron un aumento significativo de la señal de BRET en el modelo de activación cuando se analizó solo y mostró una fuerte inhibición de la señal de BRET inducida por HGF: 59,9%, 41,8% y 57,9% para las formas Hz1, Hz2 y Hz3 respectivamente. Asimismo, [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz2] y [224G11] [TH7 Hz3] inhibieron la señal de BRET inducida por HGF en el modelo de dimerización de

52,2%, 35,8% y 49,4% respectivamente (Figura 9A).

En contrario a [224G11]quim, la forma quimérica del anticuerpo de IgG2 224G11 ([224G11] [IgG2 quim]) no mostró efecto agonista parcial alguno solo e inhibió 66,3% del efecto de HGF sobre el modelo de activación de c-Met (Figura 10B). En el modelo de dimerización de c-Met, [224G11] [IgG2 quim] inhibió 62,4% de la señal de BRET inducida por HGF (Figura 10A).

La eficacia agonista de la segunda serie de versiones construidas por ingeniería genética del dominio bisagra de cadena pesada se evaluó en el modelo BRET de activación del c-Met (Figura 18). En contraste con c224G11, el cual tenía un efecto agonista parcial sobre la activación del c-Met, las formas quiméricas mutadas bisagra c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6], c224G11[C9Δ2-7] y c224G11[Δ5-6-7-8] del anticuerpo 224G11 no mostraron efecto significativo alguno sobre la activación del c-Met sola.

Ejemplo 7: Reconocimiento del c-Met por formas de 224G11 quiméricas y humanizadas

Se ha llevado a cabo un ELISA directo para determinar la habilidad de unión de las diversas formas quiméricas y humanizadas en el c-Met recombinante. Brevemente, c-Met dimérico recombinante de R&D Systems fue recubierto a 1,25 µg/ml en placas de 96 pocillos Immulon II. Después de una incubación durante toda la noche a 4°C, los pocillos fueron saturados con una solución de 0,5% de gelatina/PBS. A continuación, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C antes de la adición de diluciones de 2 veces de anticuerpos que se van a analizar. Las placas se incubaron durante 1 hora más antes de la adición de un HRP de IgG de cabra anti-ratón para detectar el anticuerpo murino y una HRP de cadena ligera Kappa anti-humana de cabra para el reconocimiento de anticuerpos quiméricos y humanizados. Las placas se incubaron durante una hora y se agregó el sustrato de peroxidasa TMB Uptima durante 5 min antes de la neutralización con H₂SO₄ 1M. Los resultados presentados en la Figura 11 demostraron que todas las formas analizadas eran comparables para el reconocimiento del c-Met.

Ejemplo 8: Efecto de 224G11 murino y quimérico sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 in vitro

Se cultivaron de manera rutinaria células NCI-H441 de ATCC en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escocia, Reino Unido), 10% FCS (Invitrogen

Corporation), 1% L-Glutamina (Invitrogen corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se separaron 3 días antes del uso de modo que estuviesen en la fase confluyente de crecimiento antes del plaqueo. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $3,75 \times 10^4$ células/pocillo en 200 μ l de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en placas, se agregaron los anticuerpos que se van a analizar a NCI-H441 y se incubaron a 37°C durante treinta minutos antes del agregado de HGF a una concentración final de 400 ng/ml (5 nM) durante 142 horas adicionales. El rango de dosis ensayado para cada anticuerpo es de 10 a 0,0097 μ g/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó un Mab de IgG1 murino como un control de isotipo murino y los anticuerpos ensayados eran los siguientes: m224G11 y su forma quimérica de IgG1 humana identificada como [224G11]quim. Los pocillos plaqueados con células solas +/- HGF también fueron incluidos. Luego, las células se pulsaron con 0,25 μ Ci de [3 H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) durante 7 horas y 30 minutos. La magnitud de [3 H]Timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó por recuento por centelleo líquido. Los resultados son expresados como datos de cpm no transformados para evaluar mejor la actividad agonista intrínseca potencial que podría ocurrir con Mabs anti-c-Met cuando se agregan solos a célula tumoral.

Los resultados descritos en la Figura 12 demostraron que, según lo esperado, el anticuerpo murino m224G11 no exhibió efecto agonista alguno cuando se agregó solo a células cancerígenas cualquiera sea la dosis ensayada. No se observó inhibición significativa alguna de la proliferación inducida por HGF con el control de isotipo con respecto a las variaciones de cpm observadas para este compuesto en este experimento. Cuando se agrega solo, el anticuerpo m224G11 no mostró efecto agonista alguno en comparación con el Mab control de isotipo de mIgG1 o las células solas. Se observó una actividad antiproliferativa dependiente de la dosis que alcanzó 78% para m224G11 (% de cálculo de inhibición: $100 - [(cpm \text{ de células} + Mab \text{ a ser ensayadas} - cpm \text{ media de mIgG1 "background"}) \times 100 / (cpm \text{ media de células} + HGF - cpm \text{ media células solas})]$). Sorprendentemente, la forma quimérica de los Mabs 224G11 indujo un efecto agonista dependiente de la dosis, significativo, cuando se agregó sola. Este efecto agonista tuvo un impacto sobre la inhibición in vitro de la proliferación inducida por HGF que cambió de 78% para el 224G11 murino hasta 50% para su forma quimérica. Para determinar su dicha actividad agonista intrínseca in vitro "inferior"

era compatible con un efecto in vivo sin cambiar, se produjeron tanto m224G11 como [224G11]quim para el ensayo in vivo. Como, en estudios previos, la dosis de 30 µg/ratón había demostrado una actividad in vivo significativa, esa dosis fue seleccionada para la evaluación in vivo.

Ejemplo 9: Comparación in vivo de Mabs 224G11 murinos y quiméricos en el modelo de xenoinjerto de NCI-H441

NCI-H441 es derivado de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa altos niveles de c-Met, y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

Para evaluar el efecto in vivo de anticuerpos en el modelo de xenoinjerto de NCI-H441, se alojaron ratones atímicos de seis a ocho semanas de edad en jaulas esterilizadas con filtro superior, se mantuvieron en condiciones estériles y se manipularon de acuerdo con las pautas francesas y europeas. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas con 9×10^6 células. Luego, seis días después del implante de células, se midieron los tumores (aproximadamente 100 mm³), los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumores comparable y se trataron, en primer lugar, con una dosis de carga de 60 µg de anticuerpo/ratón y luego dos veces por semana con 30 µg/dosis de cada anticuerpos que se va a analizar. Los ratones fueron monitoreados para la observación del índice de crecimiento del xenoinjerto. El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: $\pi (Pi)/6 \times \text{largo} \times \text{ancho} \times \text{altura}$. Los resultados descritos en la Figura 13 demuestran que el Mab murino desprovisto de actividad agonista se comporta, in vivo, según lo esperado, como antagonista potente incluso a la dosis analizada baja. Contrariamente a lo observado con el Mab murino, el Mab quimérico exhibió una actividad in vivo muy transitoria y el tumor escapó completamente al tratamiento a la inyección de células luego de D20. Este experimento demuestra claramente que el aumento del efecto agonista *in vitro* que dio como resultado una disminución de la actividad antagonista también fue responsable de una pérdida in vivo significativa de actividad antagonista.

Ejemplo 10: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo sobre la proliferación inducida por HGF de células NCI-H441 *in vitro*

Se cultivaron rutinariamente células NCI-H441 de ATCC en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escocia, Reino Unido), 10% de FCS (Invitrogen Corporation), 1% de L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de

proliferación, las células se dividieron 3 días antes del uso de modo que estuviesen en la fase confluyente de crecimiento antes de la colocación en placas. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $3,75 \times 10^4$ células/pocillo en 200 μ l de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en placas, los anticuerpos que se van a ensayar fueron agregados a NCI-H441 e incubados a 37°C durante treinta minutos antes de agregar HGF a una concentración final de 400 ng/ml (5 nM) durante 142 horas más. El rango de dosis ensayado para cada anticuerpo es de 10 a 0,0097 μ g/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó Mab de IgG1 murino como un control de isotipo murino y como un control negativo agonista. Los anticuerpos ensayados fueron los siguientes: i) m224G11, ii) sus formas quiméricas de IgG1 humanas respectivamente identificadas como [224G11] quim, [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim] iii) sus formas de IgG1 humanizadas respectivamente descritas como [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3]. También se incluyeron pocillos plaqueados con células solas +/- HGF. El anticuerpo entero 5D5 de Genentech disponible en el mercado en la ATCC como una línea de células de hibridoma se introdujo como un control positivo agonista completo y llamado a continuación m5D5. Luego, las células fueron pulsadas con 0,25 μ Ci de [3 H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) durante 7 horas y 30 minutos. La magnitud de [3 H]Timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó por recuento por centelleo líquido. Los resultados son expresados como datos de cpm no transformados para evaluar mejor la actividad agonista intrínseca potencial que podría ocurrir con Mabs anti-c-Met cuando se agregan solos a células tumoral.

Los resultados descritos en la Figura 14A demostraron que, según lo esperado, ni el control de isotipo ni el m224G11 exhibieron actividad agonista alguna en la proliferación de NCI-H441. El control isotipo no tuvo efecto alguno sobre la proliferación celular inducida por HGF mientras que m224G11 mostró un 66% de inhibición cuando se agregó a la concentración final de 10 μ g/ml. El m5D5 utilizado como control agonista mostró, según lo esperado, un efecto completo agonista dependiente de la dosis cuando se agrega solo a las células. Como ya se ha observado, el Mab [224G11] quim exhibió un efecto agonista dependiente de la dosis significativo y, se observó una actividad inhibidora disminuida de esta forma quimérica: 19% en lugar de 66% para la forma murina. Cuando se agregan por si solos, los 3 Mabs humanizados de IgG1 demostraron efectos agonistas

dependientes de la dosis comparados con la forma m224G11. [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2] y [224G11] [Hz3] tuvieron actividades antagonistas comparables aproximadamente 46, 30 y 35%. Estas actividades son significativamente inferiores que aquella observada para m224G11. En la Figura 14B, se analizaron diversas formas quiméricas de IgG1. Comparada con la forma [224G11] quim la cual exhibió un efecto agonista dependiente de la dosis cuando se agregó por si sola a células NCI-H441, las formas [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim] no tuvieron un efecto agonista intrínseco significativo. Su actividad antagonista era superior a la observada para el Mab m224G11 (57%) con inhibiciones que alcanzan 79, 78, 84 y 93% respectivamente para [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim] y [224G11] [TH7 quim].

Ejemplo 11: Efecto *in vitro* de diversas formas humanizadas de IgG1 del Mab 224G11

Se cultivaron rutinariamente células NCI-H441 de ATCC en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Escocia, Reino Unido), 10% de FCS (Invitrogen Corporation), 1% de L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se separaron 3 días antes del uso de modo que estuviesen en la fase confluyente de crecimiento antes de la colocación en placas. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de $3,75 \times 10^4$ células/pocillo en 200 μ l de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en placas, se agregaron los anticuerpos que se van a analizar a NCI-H441 y se incubaron a 37°C durante treinta minutos antes de agregar HGF a una concentración final de 400 ng/ml (5 nM) durante 142 horas adicionales. El rango de dosis analizado para cada anticuerpo es de 10 a 0,0097 μ g/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó Mab de IgG1 murino como un control negativo de "background" para la actividad agonista y los anticuerpos analizados eran los siguientes: i) m224G11, ii) sus formas quiméricas de IgG1 humanas respectivamente identificadas como [224G11] quim, [224G11] [TH7 quim] iii) sus formas de IgG1 humanizadas respectivamente descritas como [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]. También se incluyeron pocillos plaqueados con células solas +/- HGF. El anticuerpo entero 5D5 de Genentech disponible en el mercado en la ATCC como una línea celular de hibridoma se introdujo como un control positivo agonista completo y luego se lo llamó m5D5.

Luego, las células fueron pulsadas con 0,25 μCi de [^3H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) durante 7 horas y 30 minutos. La magnitud de [^3H]Timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó mediante recuento por centelleo líquido. Los resultados son expresados como datos de cpm no transformados para evaluar mejor la potencial actividad agonista intrínseca que podría producirse con Mabs anti-c-Met cuando se agregan por si solos a células tumorales.

La Figura 15 mostró que el Mab m224G11 exhibió el efecto inhibitor usual (74% de inhibición). La forma de IgG1 quimérica [224G11] quim tuvo, según lo esperado, un efecto agonista intrínseco dependiente de la dosis y un efecto antagonista inferior comparado con la forma murina: 33% contra 74% de inhibición. El [224G11] [TH7 quim] tuvo una actividad agonista muy débil en este experimento. Sin embargo, exhibió un efecto inhibitor elevado (81%) cercano al observado para el Mab murino. Las 2 formas humanizadas no tuvieron efecto agonista intrínseco alguno y tuvieron una actividad antagonista cercana a las observadas para el Mab murino o el [224G11] [TH7 quim] con respectivamente 67 y 76% de inhibición para [224G11] [TH7 Hz1] y [224G11] [TH7 Hz3].

Ejemplo 12: Comparación *in vivo* de Mabs 224G11 murinos, quiméricos y humanizados que portan el tipo salvaje o la bisagra construida por ingeniería genética TH7 (modelo de xenoinjerto NCI-H441).

NCI-H441 es derivado de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa altos niveles de c-Met, y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

Para evaluar la necesidad de la construcción por ingeniería genética de bisagra para ahorrar actividad *in vivo* del anticuerpo murino 224G11, se albergaron ratones atómicos de seis a ocho semanas de edad en jaulas esterilizadas con filtro superior, mantenidas en condiciones estériles y manipuladas de acuerdo con las pautas Francesas y Europeas. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas con 9×10^6 células NCI-H441. Luego, seis días después de la implantación celular, los tumores eran medibles (aproximadamente 100 mm^3), los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño tumoral comparable y se trataron, en primer lugar, con una dosis de carga de 2 mg de anticuerpo/ratones y luego dos veces a la semana con una dosis de 1 mg de cada anticuerpo que se va a ensayar. Se evaluaron diez anticuerpos en este experimento incluyendo el m224G11, la forma quimérica que exhibe la bisagra del tipo salvaje (c224G11), la forma quimérica construida por ingeniería genética TH7 (224G11[TH7 quim]), portando tres formas humanizadas la bisagra del tipo salvaje (224G11[IgG1 Hz1],

224G11[IgG1 Hz2] y 224G11 [IgG1 Hz3]) y las tres formas construidas por ingeniería genética TH7 correspondientes (224G11[TH7 Hz1], 224G11[TH7 Hz2] y 224G11 [TH7 Hz3]). Se les hizo un seguimiento a los ratones para la observación del índice de crecimiento de los xenoinjertos.

El volumen tumoral se calculó mediante la fórmula: $\pi (Pi)/6 \times \text{largo} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

Los resultados descritos en la Figura 16 demuestran que el Mab murino desprovisto de cualquier actividad agonista *in vitro* se comportó, según lo esperado, como un potente antagonista *in vivo*. En contraste con lo observado con el Mab murino, ambas formas quiméricas y humanizadas que portan la bisagra del tipo salvaje exhibieron solamente una actividad *in vivo* muy transitoria. En cualquiera de los casos, la sustitución de la bisagra del tipo salvaje por la construida por ingeniería genética - TH7 dio como resultado una completa restauración de la actividad *in vivo* observada con anticuerpos murinos. Este experimento demuestra claramente que el aumento del efecto agonista *in vitro* que dio como resultado una reducción de la actividad antagonista también fue responsable de una pérdida *in vivo* significativa de la actividad antagonista. También demuestra que el uso de una región construida genéticamente – TH7 en lugar de la del tipo salvaje es necesaria para mantener las propiedades *in vivo* del Mab murino.

Ejemplo 13: Efecto de m224G11 y su forma humanizada h224G11 sobre la regulación descendente de c-Met *in vitro*

En los siguientes ejemplos, para que lo haya lugar a duda alguna, la expresión h224G11 se refiere a la forma humanizada 224G11 [TH7 Hz3] del anticuerpo de la invención.

Se han seleccionado dos líneas celulares para ensayar la actividad de anticuerpos anti-c-Met en la degradación del receptor c-Met. A549 (#HTB-174) y NCI-H441 (#CCL-185) son dos líneas celulares NSCLC de la recolección ATCC. Las células NCI-H441 se sembraron en RPMI 1640 + 1% de L-glutamina + 10% de FBS inactivado por calor, a 3×10^4 células/cm² en placas de seis pocillos durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Las células A549 se sembraron en F12K + 10% de FBS inactivado por calor, a 2×10^4 células/cm² en placas de seis pocillos durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

A continuación, las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de ser sometidas a privación de suero durante 24 horas adicionales. Se agregaron los anticuerpos anti-c-Met (10 µg/ml),

mlgG1(10 µg/ml) irrelevante, o HGF (400 ng/mL) en medio DMEM libre de suero a 37°C. Después de 4 horas o 24 horas de incubación, el medio se retiró suavemente y las células se lavaron dos veces con PBS fría. Las células se lisaron con 500 µL de buffer de lisis enfriado con hielo [50 mM de Tris-HCl (pH 7,5); NaCl 150 mM; 1% de Nonidet P40; 0,5% de desoxicolato; y 1 tableta de cóctel de inhibidor de proteasa completo más 1% de antifosfatasa]. Los lisados celulares se agitaron durante 90 min a 4°C y se aclararon a 15.000 rpm durante 10 minutos. En esta etapa, los lisados celulares pudieron almacenarse a -20°C hasta ser necesarios para el análisis western blot. Se cuantificó la concentración proteica utilizando BCA. Se separaron los lisados de células enteras (5µg en 20 µl) por SDS-PAGE y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Las membranas se saturaron durante 1 h a TA con TBS-Tween 20 0,1%(TBST); 5% de leche en polvo descremada y se sondearon con anticuerpo anti-c-Met (dilución 1/1000) durante toda la noche a 4°C en TBST-5% de leche en polvo descremada. Los anticuerpos se diluyeron en solución salina tamponada con TRIS -0,1% de tween 20 (v/v) (TBST) con 1% de leche en polvo descremada. A continuación, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1:1000) durante 1 h a TA. Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron con ECL (Pierce # 32209). Después de la visualización de c-Met, las membranas se lavaron una vez más con TBST y se incubaron durante 1 h a TA con anticuerpo anti-GAPDH de ratón (dilución 1/200 000) en TBST-5% de leche en polvo descremada. Luego, las membranas se lavaron en TBST y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, durante 1 h a TA. Las membranas se lavaron y GAPDH se reveló utilizando ECL. Se midió la intensidad de banda por densitometría.

Los resultados presentados en las Figuras 19A y 20A demostraron que tanto m224G11 como h224G11 son capaces de regular en forma descendente y significativamente c-Met, de un modo dependiente de la dosis, en líneas de células A549 y NCI-H441. La regulación descendente ya es significativa después de un tiempo de incubación de 4 horas y siguió aumentando a 24 horas. Los histogramas presentados en las Figuras 19A y 20A corresponden a los valores medios o respectivamente 4 y 3 experimentos independientes. Se incluyeron las imágenes de Western blot correspondientes a un experimento significativo en las Figuras 19B y 20B.

Ejemplo 14: Efecto de m224G11 y su forma humanizada h224G11 sobre la propagación de c-Met *in vitro*

28

Las formas propagadas solubles del receptor c-Met se producen naturalmente en el suero de ratones con xenoinjerto de tumor humano o en suero de paciente humano con tumores que expresan c-Met. Adicionalmente, los anticuerpos dirigidos contra c-Met tales como el Mab DN30, son descritos como inductores de la propagación de c-Met en experimentos *in vitro*. Para determinar si el m224G11 como ese tipo de propiedad, las células se sembraron en placas de seis pocillos en medio de FCS al 10%. Cuando alcanzaron aproximadamente 80% de confluencia, se retiró el medio y se agregó medio de cultivo completo fresco +/- los compuestos que se van a ensayar. Las células se incubaron 72 horas adicionales con m224G11, un control de isotipo mlgG1 o PBS. Se introdujo PMA (acetato de forbol meristato) como un inductor de la propagación. También se ensayó HGF en células para determinar el impacto del ligando de c-Met sobre la propagación natural. Los sobrenadantes se recolectaron y filtraron en 0,2 μ m antes del uso en un ensayo ELISA cuyas formas solubles de c-Met fueron capturadas con un anticuerpo anti-c-Met que no reconoce el mismo epítipo como m224G11 o el c11E1 (Figura 21). Por añadidura, las células de cada pocillo se lavaron una vez con PBS y se lisaron para determinar la concentración proteica. Para el ELISA, 224D10 se utilizó como un anticuerpo de captura y después saturación de placas, los sobrenadantes filtrados de placas de seis pocillo se agregaron en el ensayo ELISA. Se utilizó una forma de c-Met monomérica como un control positivo. Después de la incubación de los sobrenadantes, las placas se lavaron para eliminar el c-Met no unido y se utilizó c11E1 para detectar c-Met capturado por el Mab 224G11. La revelación del ensayo se llevó a cabo finalmente mediante la adición de un anticuerpo policlonal anti-hFc HRP-conjugado.

Los resultados mostrados en la Figura 22 indican que se produjo una propagación natural de c-Met cuando las células se cultivaron durante 72 horas *in vitro*. No se observó efecto alguno del mlgG1. Sin embargo, la adición de m224G11 pareció inhibir la propagación del c-Met. Estos resultados fueron confirmados para 3 otras líneas celulares (Hs746T, EBC1 y MKN45) en la Figura 23. En ese segundo experimento, el PMA, agregado como un inductor de propagación positivo, aumentó significativamente, según lo esperado, la propagación del c-Met por lo menos en 2 líneas celulares (Hs746T y MKN45). Finalmente, en un tercer experimento (Figura 24), se introdujo HGF como un control. No se indujo propagación adicional por HGF en comparación con células solas o células + mlgG1. Una vez más, se observó una inhibición significativa de la propagación de c-Met con m224G11.

Ejemplo 15: Efecto intrínseco de h224G11 Ab sobre diversas líneas celulares

En experimentos previos descritos en esta patente, se ha demostrado que, en contraste con lo observado con otros anticuerpos tales como 5D5, el m224G11 y su forma humanizada h224G11 no exhiben actividad intrínseca significativa en líneas celulares tumorales. Para extender esta propiedad a otras líneas celulares, se llevaron a cabo experimentos western blot y fosfo-ELISA con el anticuerpo por si solo, agregado en diversos momentos, en un conjunto de líneas de células cancerígenas, con niveles variables de expresión de c-Met, incluyendo Hs746T, NCI-H441, Hs578T, NCI-H125, T98G, MDA-MB-231, PC3. También se llevó a cabo el mismo ensayo en una célula normal: HUVEC.

El método para el ensayo ELISA de fosfo cMet ya fue descrito en el ejemplo 5 de la presente solicitud de patente. Para el análisis western, se prepararon lisados proteicos a partir de células peletizadas mediante incubación en buffer de lisis con proteasas e inhibidores de fosfatasa [10nM Tris (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 0,5% de Nonidet P40, fluoruro sódico 100 mM, pirofosfato sódico 10 mM, ortovanadato sódico 2 mM, PMSF 2 mM, 10 mg/ml de leupeptina, 10 mg/ml de aprotinina] a 4°C. Se aclararon los lisados proteicos de restos celulares por centrifugación, se resolvieron por electroforesis en geles 8% SDS-PAGE, y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para los experimentos con c-Met, los lisados fueron inmunoprecipitados para proteína específica de interés antes de la electroforesis y transferencia.

Los resultados presentados en las Figuras 25 a 32 demuestran una vez más que no se observó actividad intrínseca alguna del anticuerpo h224G11 en las células ensayadas.

Ejemplo 16: Comparación in vivo del anticuerpo 224G11 murino de tipo salvaje con una forma del 224G11 quimérico con modificación en la región bisagra descrita como 224G11[C2D5-7] (modelo de xenoinjerto NCI-H441).

El NCI-H441 deriva de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa niveles elevados de c-Met y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

A los efectos de evaluar la necesidad de la modificación en la región bisagra para proteger la actividad in vivo del anticuerpo murino 224G11, se colocaron en jaulas tapadas con filtro esterilizado ratones atímicos de seis a ocho semanas de vida, se los mantuvo en condiciones estériles y se los manipuló de acuerdo con los lineamientos franceses y europeos. A los ratones se les inyectó

por vía subcutánea 9×10^6 de células NCI-H441. Posteriormente, a los seis días del implante celular, fue posible medir los tumores (aproximadamente 100 mm^3), se dividió a los animales en grupos de seis ratones con tamaño de tumor comparable y se los trató primero con una dosis de carga de 2 mg de anticuerpo/ratón y luego dos veces por semana con 1 mg/dosis de cada anticuerpo a ser evaluado. Se llevó a cabo un seguimiento de los ratones a fin de observar el índice de crecimiento del xenoinjerto. El volumen tumoral fue calculado por medio de la fórmula: $\pi (\text{Pi})/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{alto}$. Los resultados que se describen en la Figura 33 demuestran que el Mab murino desprovisto de toda actividad agonista *in vitro*, se comporta, según lo esperado, como un potente antagonista *in vivo*. Tal como lo sugieren los resultados obtenidos *in vitro*, en los ensayos de fosforilación, el anticuerpo con modificación en la región bisagra 224G11[C2D5-7], que no demostraba un efecto agonista significativo, demuestra una fuerte actividad *in vivo*, comparable a la del m224G11 en el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

Ejemplo 17: Evaluación de h224G11 en un ensayo ADCC

Puesto que h224G11 es del isotipo IgG1, el ADCC podría ser parte de su eficacia *in vivo* en seres humanos. Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de citotoxicidad de liberación [^{51}Cr] usando ya sea células Hs746T o NCI-H441 como células objetivo y células NK purificadas a partir de linfocitos mononucleares de sangre periférica humana.

En resumen, se incubaron un millón de células objetivo Hs746T o NCI-H441 con o sin 20 μg de h224G11 Ab en presencia de 100 μCi de ^{51}Cr (Perkin Elmer) por espacio de 1 hr. A continuación, se plaquetearon 4×10^3 células con una cantidad creciente de células asesinas naturales (NK) aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando una selección negativa (Stemcell Technologies). Las células se incubaron juntas durante un lapso adicional de 4 horas a 37°C . Se calculó el porcentaje de lisis celular siguiendo la fórmula: $[(\text{liberación experimental de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr}) / (\text{liberación total de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación espontánea } ^{51}\text{Cr})] \times 100$. La liberación espontánea representa los recuentos obtenidos cuando las células objetivo fueron cultivadas en ausencia de células asesinas naturales. La liberación total representa los recuentos obtenidos cuando las células objetivo fueron lisadas con 1% Triton X-100. El h224G11 aumentó significativamente la lisis de tanto células Hs746T (Figura 34a) como NCI-H441 (Figura 34b) en un 62,9% y 63,2%, respectivamente, en una relación de células NK/Objetivo de 100.

Ejemplo 18: Estudios Inmunohistoquímicos (IHC)

Procedimientos para la tinción IHC de tumores incrustados en parafina: Se fraccionaron secciones de 8 a 12 μ M de tumor congelado e inmediatamente se las fijó en acetona pre enfriada -20°C durante 3 minutos. Los cortes se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora. Luego de dos lavados en PBS se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena usando Reactivo de Bloqueo de Peroxidase (Peroxidase Blocking Reagent) (Dako K4007) durante cinco minutos. Las secciones fueron lavados con PBS y se incubaron en reactivo de bloqueo avidina/biotina (Dako X0590) inmediatamente antes de la saturación de los sitios no específicos en PBS-BSA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se incubaron los cortes con h224G11 biotinilado (50 a 10 $\mu\text{g/ml}$) o IgG1/kappa biotinilado humano (50 a 10 $\mu\text{g/ml}$, el Sitio de Unión) como control negativo durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con complejo universal estreptavidina-peroxidasa (Dako K0679) por espacio de 30 a 45 minutos. Se usó 3-amino-9-etilcarbazol para el desarrollo de un producto de reacción de color rojo (Sigma). Los cortes fueron sumergidos en hematoxilina durante 4 minutos para contrateñir (Dako S3309).

Los resultados están representados en la Figura 35.

El h224G11 tiñe diferencialmente la membrana celular de diversos tipos de tumor. En este procedimiento inmunohistoquímico, el producto de reacción rojo se correlaciona con la tinción positiva de la membrana celular y la falta de producto de reacción rojo se correlaciona con la tinción negativa y la no visualización de la membrana celular. El control IgG, IgG1/kappa humano es un control correlacionado con el isotipo.

REIVINDICACIONES

Divisional

29

1. Un anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional o derivado del mismo, capaz de inhibir la dimerización de c-Met, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de las respectivas secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos: 1, 2 y 3, y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de las respectivas secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 5, 6 y 7, en donde dicho anticuerpo consiste en un anticuerpo quimérico, humano o humanizado y en donde también comprende una región de bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 56.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicha región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 57 o 21.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicha región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 22 o de la SEQ ID No: 23.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 8, 9 o 10.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 8, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 22.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 9, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 22.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 10, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 22.

8. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 4; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 8, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 23.
9. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 9, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 23.
10. El anticuerpo de la reivindicación 1, o un fragmento funcional o derivado del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4; un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 10, y una región bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 23.
11. Un ácido nucleico aislado, el cual se elige a partir de los siguientes ácidos nucleicos:
 - a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 10;
 - b) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos definidos en a).
12. Un ácido nucleico aislado, el cual se elige a partir de un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, según la reivindicación 11 y en donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica para la región bisagra de dicho anticuerpo comprende o tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las secuencias SEQ ID Nos: 29 o 30.
13. Un vector que comprende un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 11 o 12.
14. Una célula huésped aislada que comprende un vector como se reivindica en la reivindicación 13.
15. Un animal transgénico, con la excepción del hombre, que comprende al menos una célula transformada por un vector como se reivindica en la reivindicación 13.
16. Un proceso para la producción de un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) cultivo en un medio bajo condiciones de cultivo apropiadas de una célula como se reivindica en la reivindicación 14; y
 - b) recuperación de dicho anticuerpo, o fragmento funcional o derivado del mismo, así producido a partir del medio de cultivo o dichas células cultivadas.
17. El anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho anticuerpo se acopla químicamente a un agente citotóxico.
18. El anticuerpo de la reivindicación 17, en donde dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores de la función de la cromatina, agentes anti-angiogénesis, agentes anti-estrogénicos, agentes anti-andrógenos o inmunomoduladores.
19. El anticuerpo de la reivindicación 17 o 18, en donde dicho agente citotóxico es un inhibidor de la mitosis.
20. El anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, de las reivindicaciones 1 a 10 y 17 a 19 como un medicamento.
21. Una composición que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 10, y 17 a 20.
22. La composición de la reivindicación 21, en donde dicha composición comprende, además, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un anticuerpo anti-tumoral.
23. La composición de la reivindicación 21, en donde dicha composición comprende, además, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un agente citotóxico/citostático.
24. La composición de la reivindicación 23, en donde dicho agente citotóxico/citostático se acopla químicamente a al menos uno de los elementos de dicha composición para uso simultáneo.
25. La composición de la reivindicación 24, en donde dicho agente citotóxico/citostático se selecciona del grupo que consiste de agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos, inhibidores de la función de la cromatina, agentes anti-angiogénesis, agentes anti-estrogénicos, agentes anti-andrógenos o inmunomoduladores.
26. La composición de la reivindicación 24 o 25, en donde dicho agente citotóxico/citostático es un inhibidor de la mitosis.

27. La composición de la reivindicación 21, en donde uno, al menos, de dichos anticuerpos, o un fragmento funcional o derivado de los mismos, está conjugado con una toxina celular y/o un radioelemento.
28. Un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una subexpresión del receptor c-Met a partir de una muestra biológica en la que se sospecha la presencia anormal del receptor c-Met, en donde dicho método comprende una etapa en donde dicha muestra biológica es puesta en contacto con un anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 10 y 17 a 20, o un fragmento funcional o derivado del mismo.
29. El método de diagnóstico *in vitro* de la reivindicación 28, en donde dicho método comprende una etapa en donde dicho anticuerpo está marcado.

83

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Goetsch, Liliane
Wurch, Thierry
Bes, Cédric

<120> Anticuerpo anti-cMet novedoso

<130> D27117PROV1

<160> 117

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr Thr
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala
1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

84

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 5

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 6
<211> 3
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 6

Arg Ala Ser
1

88

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 7

Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

87

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

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

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 11
ggctacatct tcacagcata cacc 24

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 12
attaaaccca acaatgggct ggcc 24

<210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 13
gccaggagcg aaattacaac agaattcgat tac 33

<210> 14
<211> 354
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 14
cagggtccagc tgggtgcaatc cggcgcagag gtgaagaagc caggcgcttc cgtgaagggtg 60
agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaaccca acaatgggct ggccaactac 180
gcccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaagggata ccagcatcag caccgcatat 240
atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgcgc caggagcgaa 300
attacaacag aattcgatta ctgggggcag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctct 354

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 15
gaatctgtgg actcttacgc aaacagcttt 30

<210> 16
<211> 9
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 16
agggcttct 9

<210> 17
<211> 27
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 17
cagcagtcca aggaggaccc cctgact 27

<210> 18
<211> 333
<212> ADN
<213> lus musculus

<400> 18
gacattgtgc tgaccacagtc tcccgatagc ctggccgtgt ccctgggcca gagggctacc 60
atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcactgggtat 120
cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgattaca gggcttctac caggggagagc 180
ggcgtgcccc atagggtcag cggatctggc agcaggaccg actttacact gaccatctcc 240
agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccccctg 300
actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aag 333

<210> 19
<211> 333
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 19
gacattgtga tgaccacagtc tcccgatagc ctggccgtgt ccctgggcca gagggctacc 60

atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcactggat 120
 cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagc 180
 ggcgtgcccg ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccccctg 300
 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aag 333

<210> 20
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 20
 gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggctacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttct gcactggat 120
 cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagc 180
 ggcgtgcccg ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccccctg 300
 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aag 333

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia proteica bisagra artificial de consenso

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es P o R

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es K o R

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es S, D o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es G, D o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es K, H o V

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (8)..(8)
<223> Xaa es E, P, T o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es P o I

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (11)..(11)
<223> Xaa es P o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (13)..(13)
<223> Xaa es P o T

<400> 21

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> bisagra artificial derivada de IgG2

<400> 22

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 23

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
1 5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 24

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 25

Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Pro
1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 26

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 27

<211> 13
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 27

Pro Arg Asp Cys Gly Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 28

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 29
<211> 33
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> bisagra artificial derivada de IgG2

<400> 29
aggaagtgct gtgtggagtg cccccctgc cca 33

<210> 30
<211> 36
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia artificial derivada de IgG1

<400> 30
ccccgggact gtgggtgcaa gccttgcat tgtacc 36

<210> 31
<211> 36
<212> ADN

93

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 31

cccaagagct gtgggtgcaa gccttgcat tgtacc 36

<210> 32

<211> 36

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 32

ccaaagagct gcggctgcaa gcctgtatc tgtccc 36

<210> 33

<211> 39

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 33

ccacgggact gtggctgcaa gccctgccct ccgtgtcca 39

<210> 34

<211> 39

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 34

cccagagact gtgggtgtca cacctgccct cctgtcct 39

<210> 35

<211> 36

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> bisagra artificial derivada de IgG1

<400> 35

cccaaaagct gcgattgccca ctgtcctcca tgtcca 36

<210> 36
<211> 443
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

95

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 37
<211> 445
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 37

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

97

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 38
<211> 218
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 38

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 39
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
 20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 40
<211> 218
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 41
<211> 1332

<212> ADN

<213> mus musculus

<400> 41

caggtccagc tgggtcaatc cggcgagag gtgaagaagc caggcgcttc cgtgaagggtg 60
 agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
 cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaacca acaatgggct ggccaactac 180
 gcccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaagggata ccagcatcag caccgcatat 240
 atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgcg caggagcgaa 300
 attacaacag aattcgatta ctgggggcag ggcacctggt tgaccgtgtc ctctgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcg cctgtctcca gaagcaccag cgagagcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac tccccgagc cctgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc tccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcca agcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
 tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaccgtgga gaggaagtgc 660
 tgtgtggagt gccccccctg cccagcccc ccagtggccg gaccacgct gttctgttc 720
 ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaacct cagaggtgac ctgtgtggtg 780
 gtggacgtgt cccacgagga ccccgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttta acagcacctt ccgggtggtg 900
 tccgtgtga cctgtgtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggctc 960
 tccaacaagg gcctgccagc ccccatcgaa aagaccatca gcaagaccaa gggacagcca 1020
 agagagccac aggtctacac cctgcccccc agcagggagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccaa tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttctgt acagcaagct gacagtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260
 agctgtccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320
 tccccaggct ga 1332

<210> 42

<211> 1341

<212> ADN

<213> mus musculus

<400> 42

caggtccagc tgggtcaatc cggcgcagag gtgaagaagc caggcgcttc cgtgaagggtg 60
 agctgtaagg cctctggcta catcttcaca gcatacacca tgcactgggt gaggcaagct 120
 cctgggcagg gactggagtg gatgggatgg attaaaccca acaatgggct ggccaactac 180
 gccagaaat tccagggtag ggtcactatg acaaggata ccagcatcag caccgcatat 240
 atggagctga gcaggctgag gtctgacgac actgctgtct attattgcg caggagcgaa 300
 attacaacag aattcgatta ctgggggcag ggcaccctgg tgaccgtgtc ctctgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccgcttcaa agagtacctc aggcggaact 420
 gccgctcttg gttgcctgt gaaggactat ttctgagc cgtgacgggt cagctggaac 480
 tctggcgac tgactagcgg cgtacacaca ttccctgcgg tgctccaaag ttccgggctg 540
 tactactgt cctccgtgt gaccgtcca tctagttccc tcgggacaca gacatacatc 600
 tgtaatgtga atcataagcc ttcaaacc aaggtcgaca aacgggtcga gccaaaagc 660
 tgcgattgcc actgtctcc atgtccagcc cccgaactgt tgggcggacc gagcgtgttc 720
 ttgtttcac ccaagccaa agatacctc atgacagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggcct gccagccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacacctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcg cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccagtgtct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcagaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 43

<211> 657

<212> ADN

<213> mus musculus

<400> 43

gacattgtgc tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggtacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcactggtat 120
 cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagc 180
 ggcggtcccg ataggttcag cggatctggc agcaggaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300
 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aagcgtagc tggccgctcc cagcgtgttc 360
 atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct accccaggga ggccaagggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

<210> 44

<211> 657

<212> ADN

<213> mus musculus

<400> 44

gacattgtga tgaccagtc tccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggtacc 60
 atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttat gcactggtat 120
 cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagc 180
 ggcggtcccg ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240
 agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccctg 300
 actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aagcgtagc tggccgctcc cagcgtgttc 360
 atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct accccaggga ggccaagggtg cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtagc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

(10)

<210> 45
<211> 657
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 45
gacattgtga tgaccagtc tcccgatagc ctggccgtgt ccctgggcga gagggtacc 60
atcaactgta aaagctccga atctgtggac tcttacgcaa acagctttct gcactggtat 120
cagcaaaagc caggccaacc tccaaagctg ctgatttaca gggcttctac caggagagac 180
ggcgtgcccg ataggttcag cggatctggc agcggcaccg actttacact gaccatctcc 240
agcctgcagg ccgaagatgt ggcagtctat tactgccagc agtccaagga ggacccccctg 300
actttcgggg gtggtactaa agtggagatc aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 360
atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
aacaacttct accccaggga ggccaagggt cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 480
ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
agcacctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
accaccagg gcctgtccag ccccgtagcc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

<210> 46
<211> 118
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 46

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ala Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 112
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 47

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
100 105 110

<210> 48
<211> 354
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 48
gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attagccca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctcc 354

<210> 49
<211> 333
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 49
gatattgtgc tgacacagtc tcccgcaagc ctcgctgta gcctgggtca acgggccaca 60
attagttgtc ggcctctga atccgtcgac tcttatgcta acagctttat gcactggtat 120
caacagaagc ccgggcagcc acctaaactg ctgatctaca gggccagcaa tctggagagt 180
ggcatcccag ctagatttag cggttccggg tccaggaccg acttcactct gaccatcaac 240
cccgtggagg cagacgacgt ggccacttac tactgccagc agtctaaaga ggatcccctc 300
acattcggct ccggaacaaa gctggaaatg aag 333

<210> 50
<211> 443
<212> PRT
<213> mus musculus

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 51
<211> 446
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 51

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

111

225230235240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245250255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260265270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275280285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

290295300

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

305310315320

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

325330335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340345350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355360365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370375380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

385390395400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405410415

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

420425430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435440445

<210> 52
<211> 218
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 52

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr
20 25 30

Ala Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 53
<211> 1332
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 53
gagggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctgggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcg cctgtctca gaagcaccag cgagagcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcca agcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gaggaagtgc 660
tgtgtggagt gccccccctg cccagccccc ccagtggccg gaccagcgt gttcctgttc 720
cccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcagaacct ccgaggtgac ctgtgtggtg 780
gtggacgtgt cccacgagga ccccgaggtg cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 840
gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagttta acagcacctt ccgggtggtg 900
tccgtgctga ccgtggtgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaaggtc 960
tccaacaagg gcctgccagc ccccatcgaa aagaccatca gcaagaccaa gggacagcca 1020
agagagccac aggtctacac cctgcccccc agcagggagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
tcctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140

aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccaa tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttctgt acagcaagct gacagtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260
 agctgtccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320
 tccccaggct ga 1332

<210> 54
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 54
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccgtcttcaa agagtacctc aggcggaact 420
 gccgctcttg gttgccttgt gaaggactat ttctctgagc ccgtgacggt cagctggaac 480
 tctggcgcac tgactagcgg cgtacacaca ttccctgcgg tgctccaaag ttccgggctg 540
 tactactgt cctccgttgt gaccgttcca tctagttccc tcgggacaca gacatacatc 600
 tgtaatgtga atcataagcc ttcaaacc aaggtcgaca aacgggtcga gcccaaaagc 660
 tgcgattgcc actgtctcc atgtccagcc cccgaactgt tgggcggacc gagcgtgttc 720
 ttgtttccac ccaagcccaa agataccctc atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1200

115

ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 55
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 55
 gatattgtgc tgacacagtc tcccgcaagc ctcgctgtta gcctgggtca acggggccaca 60
 attagttgtc ggcctctga atccgtcgac tcttatgcta acagctttat gcactggtat 120
 caacagaagc ccgggcagcc acctaaactg ctgatctaca gggccagcaa tctggagagt 180
 ggcatcccag ctagatttag cggttccggg tccaggaccg acttcaactt gaccatcaac 240
 cccgtggagg cagacgacgt ggccacttac tactgccagc agtctaaaga ggatccccctc 300
 acattcggct ccggaacaaa gctggaaatg aagcgtacgg tggccgctcc cagcgtgttc 360
 atcttcccc caagcgacga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct accccaggga ggccaagggt cagtggaagg tggacaacgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt caccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcacctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtagcc aagagcttca acaggggcga gtgctga 657

<210> 56
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> secuencia proteica bisagra artificial de consenso

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (1)..(1)
 <223> X es P, R, C o nada

<220>
 <221> MUTÁGENO
 <222> (2)..(2)

<223> X es K, C, R o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (3)..(3)
<223> X es S, C, D o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (5)..(5)
<223> X es D, C, G o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (6)..(6)
<223> X es K, C o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (7)..(7)
<223> X es T, C o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (8)..(8)
<223> X es H, V, K o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (9)..(9)
<223> X es T, C, E, P o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (11)..(11)
<223> X es P o I

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (12)..(12)
<223> X es P o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (14)..(14)
<223> X es P o T

<400> 56

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa
1 5 10

<210> 57

1A

<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> secuencia proteica bisagra artificial de consenso

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (1)..(1)
<223> X es P, R, C o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (2)..(2)
<223> X es K, C, R o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (3)..(3)
<223> X es S, C, D o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (5)..(5)
<223> X es D, C, G o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (6)..(6)
<223> X es K, C o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (7)..(7)
<223> X es T, C o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (8)..(8)
<223> X es H, V, K o nada

<220>
<221> MUTÁGENO
<222> (9)..(9)
<223> X es T, C, E, P o nada

<400> 57

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 58
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 58

Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 59

Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 60

Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 61
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 61

Pro Lys Ser Cys Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 62

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 63

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 64

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 65

Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 66
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 66

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 67
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 67

Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 68
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 68

Pro Cys Ser Cys Lys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 69
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 69

Pro Ser Cys Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 70
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 70

Pro Ser Cys Asp Lys His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 71
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 71

Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 72
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 72

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

- <210> 73
- <211> 42
- <212> ADN
- <213> artificial

<220>

122

<223>	región bisagra artificial	
<400>	73	
tgcaagagct	gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct	42
<210>	74	
<211>	42	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	región bisagra artificial	
<400>	74	
ccctgcagct	gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct	42
<210>	75	
<211>	42	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	región bisagra artificial	
<400>	75	
cccaagtgct	gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct	42
<210>	76	
<211>	42	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	región bisagra artificial	
<400>	76	
cctaagagct	gttgcaagac ccacacctgt cccccctgcc ct	42
<210>	77	
<211>	42	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	región bisagra artificial	
<400>	77	
cccaagagct	gcgactgcac ccacacctgt cccccctgcc ct	42

127

<210> 78
<211> 42
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 78
cccaagagct gcgacaagtg ccacacctgt cccccctgcc ct 42

<210> 79
<211> 42
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 79
cccaagagct gcgacaagac ccactgtgt cccccctgcc ct 42

<210> 80
<211> 36
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 80
aagtgcgaca agaccacac ctgtcccccc tgcct 36

<210> 81
<211> 39
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 81
cccaagagct gcgactgcca cacctgtccc ccctgccct 39

<210> 82
<211> 39
<212> ADN
<213> artificial

<220>

<223>	región bisagra artificial	
<400>	82	
cccaagagct	gcgactgcac ccactgcccc ccctgccct	39
<210>	83	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	dominio bisagra artificial	
<400>	83	
ccctgcagct	gcaagcacac ctgtcccccc tgcct	36
<210>	84	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	región bisagra artificial	
<400>	84	
cctagctgct	gcacccacac ctgtcccccc tgcct	36
<210>	85	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	región bisagra artificial	
<400>	85	
cccagctgcg	acaagcactg ctgtcccccc tgcct	36
<210>	86	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	región bisagra artificial	
<400>	86	
cccaagagct	gcacctgtcc ccctgtcct	30

125

<210> 87
<211> 42
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> región bisagra artificial

<400> 87
cccaagagct gcgataagtg cgtggagtg cccccctgtc ct 42

<210> 88
<211> 448
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 88

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

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

na

355360365

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

370375380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385390395400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

405410415

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

420425430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435440445

<210> 89

<211> 448

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 89

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

151015

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

202530

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile

354045

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

505560

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65707580

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

859095

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 90
<211> 448
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 90

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

130

505560

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65707580

Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100105110

Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115120125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130135140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145150155160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165170175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180185190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195200205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr
210215220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225230235240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245250255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260265270

(3)

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 91

<211> 448

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 91

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

172

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Cys Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 92
<211> 448
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 92

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 93

<211> 448

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 93

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

137

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 94
<211> 448
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 94

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

85	90	95
Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Ala Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
		160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Cys Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
		240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 95
<211> 446
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 95

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Lys Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

142

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

- <210> 96
- <211> 447
- <212> PRT
- <213> mus musculus

143

<400> 96

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

144

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

145

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 97

<211> 447

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 97

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr		
210	215	220
His Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
240		
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
320		
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380

1247

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 98
<211> 446
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 98

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Cys Ser Cys Lys His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

149

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 99

<211> 446

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 99

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Ser Cys Cys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

151

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 100
<211> 446
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 100

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

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

152

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Ser Cys Asp Lys His Cys
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

157

245

250

255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 101

<211> 444

<212> PRT

154

<213> mus musculus

<400> 101

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

135

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

156

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 102

<211> 448

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 102

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys
210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

158

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 103
<211> 1347
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 103
gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gtgcaagagc 660
tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccagc 720
gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagttcaa ctggtacgtg 840

159

gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtag 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa ggccctgcca gcccgaatcg aaaagacat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgcctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 104
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 104
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gccctgcagc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgccctg aactgctggg cggaccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagttaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900

tacaggggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa ggccttgcca gcccgaatcg aaaagacat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtcccagg caagtga 1347

<210> 105
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 105
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttgaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgcggtga gcccaagtgc 660
 tgcgacaaga cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgagggtg 780
 acctgtgtgg tggtagcgt gtcccacgag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900

tacaggggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa ggccctgccca gcccgaatcg aaaagacat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtcccagg caagta 1347

<210> 106
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 106
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catcttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctctc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac tccccgagc ccgtgaccgt gtcttgaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca tccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcctaagagc 660
 tgttgcaaga cccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggaccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacaggggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgttaagg tgtccaacaa ggccctgccca gcccacatcg aaaagacat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcaggga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 107
 <211> 1346
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 107
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac tccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca tccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgcgactgca cccacacctg tccccctgc cctgccctg aactgctggg cggacccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgagggtg 780
 acctgtgtgg tgggtggacgt gtcccacgag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacaggggtg tgccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

163

aagtgttaagg tgtccaacaa ggcctgccca gcccgaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020
 aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccagaaac aactacaaga ccaccccccc agtctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtg 1346

<210> 108
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 108
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac tccccgagc ccgtgaccgt gtcttgaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca tccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgcgacaagt gccacacctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggacccagc 720
 gtgttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 acctgtgtgg tggtagcgt gtcccacgag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgttaagg tgtccaacaa ggcctgccca gcccgaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020

aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gagggcctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 109
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 109
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcccaagagc 660
 tgcgacaaga cccactgctg tccccctgc cctgcccctg aactgctggg cggacccagc 720
 gtgttcctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780
 acctgtgtgg tggtagcgt gtcccacgag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900
 tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tgtccaacaa ggccctgccg gcccgaatcg aaaagaccat cagcaaggcc 1020

aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagggg ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct acccaagcga catcgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1200
 agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260
 ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gagggcctgc acaaccacta caccagaag 1320
 agcctgagcc tgtccccagg caagtga 1347

<210> 110
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 110
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcataacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gaagtgcgac 660
 aagaccaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgacagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080

cagggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1200
ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 111
<211> 1344
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 111
gagggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcataacca tgcactgggt gaggcagagt 120
ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgacgtgt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccaagagc 660
tgcgactgcc acacctgtcc cccctgccct gccctgaac tgctgggcgg acccagcgtg 720
ttctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtacaa cagcacctac 900
aggggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgtaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccacca gcagggagga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1260
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
ctgagcctgt ccccaggcaa gtga 1344

<210> 112
<211> 1344
<212> ADN
<213> mus musculus

<400> 112
gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
ctggggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480
agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacac 600
tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccaagagc 660
tgcgactgca cccactgccc cccctgccct gccctgaac tgctgggcgg acccagcgtg 720
ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtacaa cagcacctac 900
aggggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgtaaggtgt ccaacaaggc cctgccagcc ccaatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
ggccagccaa gagagcccca ggtgtacacc ctgccacca gcagggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgtgta cagcaagctg accgtggaca agagcagatg gcagcagggc 1260
 aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccccaggcaa gtga 1344

<210> 113
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 113
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccctgcagc 660
 tgcaagcaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggaccca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

169

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 114
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 114
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcctggaac 480
 agcggagccc tgacctccgg cgtgcacaca ttccccgccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gcctagctgc 660
 tgcaccaca cctgtcccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900
 gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020
 cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1200

ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260

gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320

agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 115

<211> 1341

<212> ADN

<213> mus musculus

<400> 115

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggtaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60

agctgtaaga ccagcggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120

ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagccca acaatggcct ggctaactat 180

aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240

atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300

atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360

accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcaccag cggcggcaca 420

gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480

agcggagccc tgacctccgg cgtgcacacc ttccccgccc tgctgcagag cagcggcctg 540

tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccagctgc 660

gacaagcact gctgcccccc ctgccctgcc cctgaactgc tgggcggacc cagcgtgttc 720

ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780

gtggtggtgg acgtgtccca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggtg cgtggacggc 840

gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 900

gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960

aaggtgtcca acaaggccct gccagcccca atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 1020

cagccaagag agccccaggt gtacaccctg ccaccagca gggaggagat gaccaagaac 1080

caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatcgc cgtggagtgg 1140

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccagtgct ggacagcgac 1200

171

ggcagcttct tctgtacag caagctgacc gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggcaagtg a 1341

<210> 116
 <211> 1335
 <212> ADN
 <213> mus musculus

<400> 116
 gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
 agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat 180
 aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtctcttc cacagcttac 240
 atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300
 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
 accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc ccagcagca agagcacaag cggcggaaca 420
 gccgccctgg gctgcctggg gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480
 agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540
 tacagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agcagcagcc tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaagagc 660
 tgcacctgtc cccctgtcc tgcccctgag ctgtctggcg gaccagcgt gttcctgttc 720
 cccccaagc ccaaggacac cctgatgac agcagaaccc ccgaggtgac ctgtgtgggt 780
 gtggacgtgt cccacgagga ccagaggtg aagtcaact ggtacgtga cggcgtggag 840
 gtgcacaacg ccaagaccaa gccagagag gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg 900
 tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgtaagggt 960
 tccaacaagg cctgccagc cccaatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca 1020
 agagagcccc aggtgtacac cctgccaccc agcagggagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
 tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac ccaagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1140
 aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc accccccag tgctggacag cgacggcagc 1200
 ttcttctgt acagcaagct gaccgtggac aagagcagat ggcagcaggg caacgtgttc 1260

172

agctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1320

tccccaggca agtga 1335

<210> 117

<211> 1347

<212> ADN

<213> mus musculus

<400> 117

gagggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctgggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60

agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120

ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attagccca acaatggcct ggctaactat 180

aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtctcttc cacagcttac 240

atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcgc ccggtctgag 300

atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360

accaagggcc caagcgtgtt cccgctagcc cccagcagca agagcacaag cggcggaaca 420

gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac 480

agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540

tacagcctga gcagcgtggt gaccgtgcct agcagcagcc tgggcaccca gacctacatc 600

tgcaacgtga accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtgga gccaagagc 660

tgcgataagt gcgtagagtg cccccctgt cctgcccctg agctgctggg cggaccacgc 720

gtgttctgt tccccccaa gccaaggac accctgatga tcagcagaac ccccgaggtg 780

acctgtgtgg tggtagcgt gtcccacgag gaccagagg tgaagtcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggagcagta caacagcacc 900

tacaggggtg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 960

aagtgtagg tgtccaacaa ggccctgcc accccaatcg aaaagacat cagcaaggcc 1020

aagggccagc caagagagcc ccaggtgtac accctgccac ccagcagga ggagatgacc 1080

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggttct acccaagcga catgcccgtg 1140

gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtctgtgac 1200

agcgacggca gcttcttct gtacagcaag ctgaccgtgg acaagagcag atggcagcag 1260

177

ggcaacgtgt tcagctgctc cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1320

agcctgagcc tgtccccagg caagtga

1347

RESUMEN

La invención se refiere a un anticuerpo novedoso capaz de unirse específicamente al receptor c-Met humano y/o capaz de inhibir específicamente la actividad de tirosina quinasa de dicho receptor, con una actividad antagonista mejorada, comprendiendo dicho anticuerpo una región bisagra modificada.

La invención se refiere además a una composición que comprende ese tipo de anticuerpo antagonista de c-Met y su uso como un medicamento para tratar el cáncer.

175

PR-VJ/NT/7708/EB

117355
10.06.11

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned,

- 1. Liliane GOETSCH
- 2. Thierry WURCH
- 3. Cédric BES

acting as inventor(s) of the **International**
Application PCT/EP2009/066201
02 DECEMBER 2009

Titled:
ANTI-CMET ANTIBODY with domicile in,

- 1. 15 route de Cluses, 74130 AYZE - FRANCE
- 2. 7 route des Etoiles, Le Clos Bellevue, 74140 MACHILLY - FRANCE
- 3. 12 boulevard des Acanthes, 30250 VILLEVIEILLE - FRANCE

hereby declare(s) that he/she/they assign(s) all rights of ownership as well as all rights and privileges relating thereto without exception over the following patent application in Colombia:

No.
Titled:
to,

domiciled in,
PIERRE FABRE MEDICAMENT
45, place Abel Gance
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT - FRANCE
The assignor(s) and the assignee sign this document as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 15th day of April 2011

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

CESION

El(los) Suscrito(s),

en calidad de inventor(es)

de la solicitud de patente en Colombia

No.
Titulada:

con domicilio en,

declara(n) por el presente documento que cede(n) todos los derechos de propiedad que le(s) correspondan, así como las prerrogativas, sin excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de patente en Colombia:

No.
Titulada:

a,

domiciliada en,

El(los) cedente(s) y el cesionario firman este documento como prueba de su aceptación de la cesión.

Dado y firmado a los _____ días del mes de _____ de 200_

16 AOUT 2011

Signature of Assignor
Liliane GOETSCH

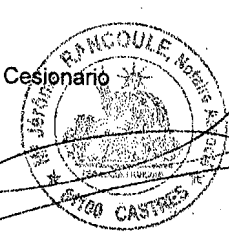
Thierry WURCH

Cédric BES

Signature of Assignee
PIERRE FABRE MEDICAMENT
Pierick ROUSSEAU, Intellectual Property Manager

Firma del Cedente

Firma del Cesionario



Vu pour la légalisation des signatures de Liliane GOETSCH
Thierry WURCH
Cédric BES

Pierick ROUSSEAU

**NOTARIAL CERTIFICATE
(CORPORATION)**

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

On this 19th day of April of 2011 personally appeared before me
Pierick ROUSSEAU
to me known, and known to me to be the person who signed
the foregoing instrument who being by me duly sworn did
depose and say that he (she) is the Intellectual Property
Director

of (name of applicant)
PIERRE FABRE MEDICAMENT

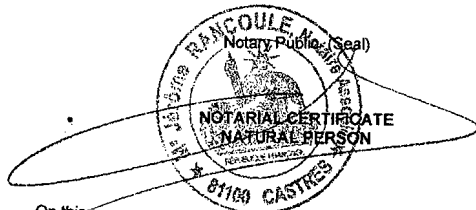
Which is legally constituted for a term not yet expired, that
deponent is authorized by said Company to confer this
Assignment document: that the seal affixed hereunto by the
deponent in the name and on behalf of said Corporation is the
corporate seal thereof; and that the purpose for which this
instrument is granted is included within the corporate purpose
of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the
documents that prove the existence of the company.

State of France
under date of

and that he (she) who grants the present Assignment
document is its Representative.

Vu pour la légalisation de la signature de Pierick Rousseau



On this
personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the
foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s)
the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior
documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él es

de (nombre del solicitante)

Sociedad legalmente constituida para un período de duración
que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado
por dicha compañía para conferir este documento de Cesión;
que el sello estampado por él al pie de tal Cesión, en nombre
y representación de la expresada compañía, es el sello oficial
de ella; y que el objeto para el cual se confiere este
instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las
pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente documento de Cesión es su
representante.

Notario Público (sello)

**CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL**

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es)
declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos
que en él se expresan.

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

176

PR-VJ/117/1081 EB



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 - République Française

Le présent acte public

2 - a été signé par Maître Jérôme RANCOULE

3 - agissant en qualité de NOTAIRE

4 - est revêtu du sceau de l'étude à CASTRES

Atteste

5 - à TOULOUSE

6 - le 16 JUIN 2011

7 - par le procureur général près la cour d'appel de Toulouse

8 - Sous n° 4151

9 - Sceau

10 - Signature

"L'Apostille confirme seulement l'authenticité de la signature, du sceau ou timbre sur le document. Elle ne signifie pas que le contenu du document est correct ou que la République française approuve son contenu."



TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL DEL DOCUMENTO DE CESIÓN a **PIERRE
FABRE MEDICAMENT**, firmado por los cedentes y el cesionario.

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

Visto para la legalización de las firmas de Liliane Goetsch, Thierry Wurch, Cédric Bes, Pierick Rousseau.

Hay un sello que dice:
M^e JÉRÔME RANCOULE,
Notario Asociado
81100 Castres

177

APOSTILLA

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

1. República francesa
El presente acto público
2. Ha sido firmado por EL SEÑOR JÉRÔME RANCOULE
3. Actuando en capacidad de NOTARIO
4. lleva el sello/timbre de SU DESPACHO DE CASTRES

Certificado

5. En Toulouse
6. el 16 de junio de 2011
7. por el Procurador General para el Tribunal de Apelaciones de Toulouse.
8. Bajo el No. 4151
9. Sello:

10. Firma:

(firma)

Hay tres sellos que dicen:
TRIBUNAL DE APELACIONES DE TOULOUSE

La apostilla confirma solamente la autenticidad de la firma, del sello o del timbre sobre el documento. No significa que el contenido del documento es correcto o que la República Francesa apruebe su contenido.