

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO cación  No. 13-169787- -00000-0000 Fecha: 2013-07-17 16:53:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 189
---	---

AS. 125.303

**DIRECCIÓN DE N
CONVERSIÓN, DIVISIÓN**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-016035- -00009-0000
Fecha: 2013-07-17 16:53:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 189

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

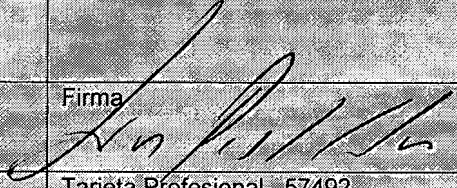
☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:												
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO 80.410.337 57492												
Apellidos y Nombre Documento de identificación Tarjeta profesional												
<table><tr><td>Dirección y domicilio</td><td>Ciudad</td></tr><tr><td>Calle 70 A #4-41</td><td>Bogotá, D.C.</td></tr><tr><td>Dirección electrónica</td><td>No. Fax</td></tr><tr><td></td><td>742-2200</td></tr><tr><td></td><td>Número telefónico</td></tr><tr><td></td><td>744-2200</td></tr></table>	Dirección y domicilio	Ciudad	Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.	Dirección electrónica	No. Fax		742-2200		Número telefónico		744-2200
Dirección y domicilio	Ciudad											
Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.											
Dirección electrónica	No. Fax											
	742-2200											
	Número telefónico											
	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 _____												

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 10 016.035	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos	
Comprobante de pago No. 13-48429, 13-20263	Fecha: 17-07-2013

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

PODER

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

Nombro(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 enseñas, 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 3rd day 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; que el sello estampado por él al pie de tal 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.

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.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 3rd day 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.



Notary Public (Seal)

**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)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 - République Française

Le présent acte public

2 - a été signé par Philippe DEXEAD

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° 7842

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 DEYVEAUX

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)

NOVEDOSOS ANTICUERPOS QUE INHIBEN DIMERIZACIÓN DE C-MET, Y SUS USOS

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a anticuerpos novedosos capaces de ligar específicamente al receptor de c-Met humano y/o capaces de inhibir específicamente la actividad de tirosina cinasa del receptor, especialmente anticuerpos monoclonales de origen murino, quimérico y humanizado, así como las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican para estos anticuerpos. Más particularmente, anticuerpos de acuerdo con la invención son capaces de inhibir la dimerización de c-Met. La invención igualmente comprende el uso de estos anticuerpos como un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cánceres o cualquier patología conectada con la sobre-expresión del receptor, así como en procesos o equipos para diagnóstico de enfermedades conectadas con la sobre-expresión de c-Met. La invención finalmente comprende productos y/o composiciones que comprenden estos anticuerpos, en combinación con otros anticuerpos y/o compuestos químicos dirigidos contra otros factores de crecimiento involucrados en avance de tumor o metástasis y/o compuestos y/o agentes anti-cáncer o agentes conjugados con toxinas y su uso para la prevención y/o el tratamiento de ciertos cánceres.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Agentes dirigidos a receptor tirosina cinasa (RTK) tales como inhibidores trastuzumab, cetuximab, bevacizumab, imatinib y gefitinib, han ilustrado el interés de hacer blanco en esta clase de proteína para tratamiento de cánceres selectos.

c-Met, es el miembro prototipo de una sub-familia de RTKs que también incluye RON y SEA. La familia c-Met RTK es estructuralmente diferente de otras familias RTK y es el único receptor de alta afinidad conocido para factor de crecimiento de hepatocitos (HGF = Hepatocyte Growth Factor), 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 se expresan ampliamente en una variedad de tejidos y su expresión normalmente se restringe 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]. Ambos se requieren para un desarrollo normal de mamífero y se ha mostrado que son particularmente

importantes en migración celular, diferenciación morfogénica, y organización de las estructuras tubulares tri-dimensionales así como crecimiento y angiogénesis [F. Baldt et al., *Nature* 1995, 376:768-771; C. Schmidt et al., *Nature* 1995:373:699-702; Tsarfaty et al., *Science* 1994, 263:98-101]. Mientras que la regulación controlada de c-Met y HGF se ha mostrado que es importante en el desarrollo, mantenimiento y reparación de tejidos de mamíferos [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 el avance de cánceres.

Señalización aberrante dirigida por una activación inapropiada de c-Met es una de las alteraciones más frecuentes observadas en cánceres de humanos y juega un papel crucial en tumorigénesis y metástasis [Birchmeier et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, 4:915- 925; L. Trusolino and Comoglio P. M., *Nat Rev. Cancer.* 2002, 2(4):289-300].

Una activación c-Met inapropiada puede surgir por mecanismos dependientes e independientes de ligando, que incluye sobre-expresión de c-Met y/o activación paracrina o autocrina o a través de ganancia en mutación de función [J.G. Christensen, Burrows J. and Salgia R., *Cancer Letters.* 2005, 226:1-26]. Sin embargo una oligomerización de receptor c-Met, en presencia o en ausencia de ligando, se requiere para regular la afinidad de enlace y cinéticas de enlace de la cinasa hacia ATP y sustratos péptido que contienen tirosina [Hays JL, Watowich SJ, *Biochemistry*, 2004 Aug 17, 43:10570-8]. c-Met activado recluta efectores de señalización a su sitio de acoplamiento o conexión múltiple ubicado en el dominio de citoplasma, resultando en la activación de varias rutas de señalización clave, 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 proliferación de células de tumor, invasión y angiogénesis y para evadir apoptosis [Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF, *Oncogene*, 2000, 19(49):5582-9; Gu H, Neel BG, *Trends Cell Biol.* 2003 Mar, 13(3): 122-30; Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM, *Oncogene.* 2000 Apr 27, 19(18):2212-23]. Además, una faceta única de la señalización c-Met respecto a otra RTK es la interacción reportada con complejos de adhesión focal y asociados sin enlace a cinasa tales como $\alpha 6 \beta 4$ integrinas [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, Valdembrì 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] que además pueden contribuir a la complejidad de regular la función celular por este receptor. Finalmente datos recientes demuestran que c-Met puede estar involucrado en resistencia a tumor de gefitinib o erlotinib, sugiriendo que la combinación del compuesto que hace blanco a EGFR como c-Met puede ser de interés significativo [Engelman JA et al., Science, 2007, 316:1039-43].

En los últimos años recientes, muchas estrategias diferentes se han desarrollado para atenuar la señalización c-Met en líneas celulares de cáncer. 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 antagonista HGF/SF NK4 para evitar enlace de ligando a c-Met [Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T, Cancer Res., 2000, 60:6737-43], ii) inhibidores de sitio de enlace ATP pequeños a c-Met que bloquean actividad de cinasa [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 de ingeniería que interfiere con el acceso al sitio de acoplamiento o conexión múltiple y ARNi (RNAi) o ribozima que reduce expresión de ligando o receptor. La mayoría de estos enfoques exhiben una inhibición selectiva de c-Met, resultando en inhibición de tumor y mostrando que c-Met puede ser de interés para intervención terapéutica en cáncer.

Dentro de las moléculas generadas para hacer blanco c-Met, algunos son anticuerpos.

La más extensamente descrita es el anticuerpo anti-c-Met 5D5 generado por Genentech [WO96/38557] que se comporta como un agonista potente cuando se agrega solo en diversos modelos y como un antagonista cuando se emplea como un fragmento Fab. Una forma de ingeniería monovalente de este anticuerpo descrita como 5D5 de un brazo (OA5D5) y producida como una

proteína recombinante en *E. Coli*, también es la materia de una solicitud de patente [WO2006/015371] por Genentech. Sin embargo, esta molécula que no puede considerarse como un anticuerpo debido a su particular adaptador, exhibe también mutaciones que pueden ser inmunogénicas en humanos. En términos de actividad, esta molécula no glicosilada es carente de funciones efectoras y finalmente no hay datos claros que demuestren que OA5D5 inhibe la dimerización de c-Met. Aún más, cuando se prueba en el modelo *in vivo* G55, una línea celular de glioblastoma que expresa c-Met pero no HGF mRNA y proteína que se desarrolla independientemente del ligando, el anti-c-Met de un brazo no tiene efecto significativo en crecimiento de tumor G55, sugiriendo que OA5D5 actúa primordialmente al bloquear enlace HGF y no es capaz de ser blanco en tumores activados independientemente de HGF [Martens T. et al, Clin. Cancer Res., 2006, 12(20):6144-6152].

Otro anticuerpo que hace blanco en c-Met se describe por Pfizer como un anticuerpo que actúa "predominantemente como un antagonista c-Met, y en algún caso o instancia como un agonista c-Met" [WO 2005/016382]. En esta solicitud no se describen datos que muestren efecto alguno de anticuerpos Pfizer en dimerización de c-Met.

Uno de los aspectos innovadores de la presente invención es generar anticuerpos monoclonales de ratón sin actividad agonista intrínseca e inhibir la dimerización de c-Met. Además de hacer blanco en tumores dependientes de ligando, este enfoque también deteriora activaciones independientes de ligando de c-Met debido a su sobre-expresión o mutaciones de los dominios intra celulares que quedan dependientes de oligomerización para señalización. Otro aspecto de la actividad de estos anticuerpos puede ser un impedimento estérico para interacción c-Met con sus asociados, que resulta en deterioro de funciones c-Met. Estos anticuerpos serán humanizados y preferencialmente sometidos a ingeniería pero no limitados como IgG1 humano para obtener funciones efectoras tales como ADCC y CDC además de funciones enlazadas a bloqueo específico del receptor c-Met.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De manera sorprende, por primera vez, los inventores han logrado generar un anticuerpo capaz de ligar a c-Met pero también capaz de inhibir la dimerización de c-Met. Si es cierto que, en la técnica previa, en ocasiones se sugiere que puede ser interesante un anticuerpo capaz de inhibir la dimerización de c-Met con sus asociados, nunca se ha descrito o sugerido claramente, un

anticuerpo capaz de hacerlo. Aún más, respecto a la especificidad de anticuerpo, no fue evidente por completo el tener éxito en la generación de este anticuerpo activo.

En un primer aspecto, un objeto de la presente invención es un proceso para la generación y selección de anticuerpos de acuerdo con la invención.

Más particularmente, la invención se refiere a un proceso para la selección de un anticuerpo anti c-Met, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, capaces de inhibir tanto activación dependiente de ligando como independiente de ligando de c-Met, este proceso comprende las siguientes etapas:

i) detectar los anticuerpos generados y seleccionar anticuerpos capaces de ligar específicamente a c-Met;

ii) evaluar *in vitro* de los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir al menos 50%, de preferencia al menos 60%, 70% o 80% de proliferación de células de tumor para al menos un tipo de tumor; y después

iii) probar los anticuerpos selectos de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la dimerización de c-Met.

Como se explicó anteriormente, la inhibición de la dimerización de c-Met es un aspecto capital de la invención ya que estos anticuerpos presentarán un interés real para una población más grande de pacientes. No solo cáncer c-Met activado dependiente de ligando, como fue el caso hasta la presente invención, sino también cáncer c-Met activado independiente de ligando, pueden tratarse con anticuerpos generados por el proceso de la presente invención.

La generación del anticuerpo puede lograrse por cualquier método conocido por la persona con destreza en la técnica, tal como por ejemplo fusión de una célula de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados u otras especies compatible con las células de mieloma selectas [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497]. Los animales inmunizados pueden incluir ratones transgénicos con sitios de inmunoglobulina humana que después producen directamente anticuerpos humanos. Otra modalidad posible puede consistir en utilizar tecnologías de expresión en fago para cribas o detectar bibliotecas.

La etapa de detección i) puede lograrse por cualquier método o proceso conocido por la persona con destreza en la técnica. Como ejemplos no limitantes pueden mencionarse ELISA, BIAcore, inmunohistoquímica, análisis FACS y cribas funcionales. Un proceso preferido consiste en una criba por ELISA

en la proteína recombinante c-Met y después por análisis FACS en al menos una línea celular tumoral, para asegurarse que los anticuerpos producidos serán capaces de reconocer también el receptor nativo en células de tumor. Este proceso se describirá en forma más precisa en los siguientes ejemplos.

De la misma manera, la etapa ii) también puede lograrse en forma clásica por un método o proceso conocido tal como por ejemplo, utilizando 3H-timidina o cualquier otro agente de tinción de ADN, MTT, evaluación ATP, etc. Un modelo de células de tumor preferido en la presente invención puede consistir en el modelo BxPC3.

Al inhibir la dimerización de c-Met, debe entenderse de preferencia la homodimerización de c-Met.

En una modalidad preferida de la etapa iii) de selección del proceso de la invención, la etapa iii) consiste en evaluar anticuerpos por análisis BRET en células que expresan tanto c-Met-RLuc/c-Met-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir al menos 30%, de preferencia 35%, 40%, 45%, 50%, 55% y más preferible 60% de la señal BRET.

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

La tecnología BRET, empleada en la etapa iii) del proceso, es bien conocida por la persona con destreza en la técnica y será detallada en los siguientes ejemplos. Más particularmente, la Transferencia de Energía por Resonancia Bioluminiscencia (BRET = Bioluminescence Resonance Energy Transfer) es una transferencia de energía no radiante, que ocurre entre un donador bio luminiscente (Renilla Luciferasa (Rluc)) y un aceptor fluorescente, un mutante de Proteína Fluorescente Verde (GFP = Green Fluorescent Protein) o Proteína Fluorescente Amarilla (YFP = Yellow fluorescent protein). En el presente caso se empleó Proteína Fluorescente Amarilla Mejorada (EYFP = Enhanced Yellow Fluorescent Protein). La eficacia de la transferencia depende de la orientación y la distancia entre el donador y aceptor. Después, la transferencia de energía puede ocurrir solo si las dos moléculas están en proximidad inmediata (1-10 nm). Esta propiedad se emplea para generar ensayos de interacción proteína-proteína. Sin duda, a fin de estudiar la interacción entre dos socios, el primero se fusiona genéticamente a la Renilla Luciferasa y el segundo al mutante amarillo de GFP. Proteínas de fusión en general, pero no en forma obligatoria, se expresan en células de mamífero. En la presencia de su substrato permeable a membrana (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante GFP está más cercano a 10

nm de Rluc, puede ocurrir una transferencia de energía y puede detectarse una señal amarilla adicional. La señal BRET se mide como la proporción entre la luz emitida por el aceptor y la luz emitida por el donador. De esta manera, la señal BRET aumentará conforme las dos proteínas de fusión se ponen en proximidad o si un cambio de conformación lleva más cerca a Rluc y mutante GFP.

Si el análisis BRET consiste en una modalidad preferida, cualquier método conocido por la persona con destreza en la técnica puede emplearse para medir la dimerización de c-Met. Sin limitación, pueden mencionarse las siguientes tecnologías: Transferencia de Energía por Fluorescencia Resonancia (FRET = Fluorescence Resonance Energy Transfer), Fluorescencia con resolución de tiempo homogénea (HTRF = Homogenous Time resolved Fluorescence), Microscopía de Formación de Imagen por Vida Útil de Fluorescencia (FLIM = Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) o Espectroscopía de Correlación cruzada de Fluorescencia de Longitud de Onda Sencilla (SW-FCCS = single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy).

Otras tecnologías clásicas también pueden emplearse tales como Co-inmunoprecipitación, Alpha screen, Entrelazamiento químico, Doble-Híbrido, Cromatografía de Afinidad, ELISA o Transferencia Far western.

En un segundo aspecto, un objeto de la invención es un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que se obtiene por el proceso. El anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados, es capaz de ligar específicamente al c-Met humano y de ser necesario, aún más de preferencia es capaz de inhibir la conexión natural de su HGF ligando y/o capaz de inhibir específicamente la actividad de tirosina cinasa del c-Met, el anticuerpo también es capaz de inhibir dimerización de c-Met. Más particularmente, los anticuerpos serán capaces de inhibir tanto activación dependiente de ligando como independiente de ligando de c-Met.

Las expresiones "fragmentos y derivados funcionales" se definirán en detalle posteriormente en la presente especificación.

Debe entenderse aquí que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir no están en su ambiente natural pero deben ser capaces de ser aislados u obtenidos por purificación de fuentes naturales, o de otra forma obtenidos por recombinación genética, o por síntesis química, y que pueden contener aminoácidos no naturales como se describirá adicionalmente.

En forma más particular, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se reivindica un anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados

funcionales, el anticuerpo se caracteriza porque comprende cuando menos una región de determinación de complementariedad de CDR seleccionada de CDRs que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID Nos. 1 a 17 y 56 a 61.

Cualquier anticuerpo, o fragmentos o derivados, que tienen al menos una CDR cuya secuencia tiene al menos 80% de identidad, de preferencia 85%, 90%, 95% y 98% de identidad, después de alineamiento óptimo con las secuencias SEQ ID Nos. 1 a 17 y 56 a 61, debe entenderse como equivalente y como consecuencia como parte de la invención.

Por regiones CDR o CDR(s), se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas definidas por IMGT.

La numeración única de IMGT se ha definido para comparar los dominios variables cualquiera que sea el receptor de 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., Pommie, 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 (I^a-CYS), triptófano 41 (TRP-CONSERVADO), aminoácido hidrofóbico 89, cisteína 104 (2^a-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única IMGT proporciona una delimitación estándar de las regiones marco (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 de determinación de complementariedad: CDRI-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Ya que los espacios representan posiciones no ocupadas, las longitudes CDR-IMGT (que se muestran entre (cuadrados) y separadas por puntos, por ejemplo [8.8.13]) se vuelven información crucial. La numeración única IMGT se emplea en representaciones gráficas 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3D en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Existen CDRs de tres cadenas pesadas y CDRs de 3 cadenas ligeras. Los términos CDR o CDRs se emplean aquí para indicar, de acuerdo con el caso, una de las regiones o varias o incluso todas estas regiones que contienen la mayoría de los residuos aminoácidos responsables por el enlace por afinidad

del anticuerpo para el antígeno o el epítipo que reconoce.

Por "por ciento de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos en el sentido de la presente invención, se pretende indicar un porcentaje de nucleótidos o de residuos aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenidos después del mejor alineamiento (alineamiento óptimo), este porcentaje es solamente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen al azar y sobre toda la longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, se llevan a cabo tradicionalmente al comparar estas secuencias después de haberlas alineado en una forma óptima, la comparación es capaz de llevarse a cabo por segmento o por "ventana de comparación". El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo además de manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], mediante el algoritmo de homología local de Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48: 443], mediante el método de búsqueda de similaridad de Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], mediante soporte lógico de computadora utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o de otra forma por el programa para comparación BLAST N o BLAST P).

El por ciento de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, se determina al comparar estas dos secuencias alineadas en una forma óptima y en donde la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos a comparar, puede comprender adiciones o deleciones respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El por ciento de identidad se calcula al determinar el número de posiciones idénticas para las cuales el residuo nucleótido o aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, al dividir este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y al multiplicar el resultado obtenido por 100, a fin de obtener el por ciento de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (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>, los parámetros empleados son aquellos dados por valor predefinido (en particular para los parámetros "open gap penalty": 5, y "extension gap penalty": 2; la matriz seleccionada por ejemplo, es la

matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar se calcula directamente por el programa.

Por secuencia de aminoácidos que tienen al menos 80%, de preferencia 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácido de referencia, aquellos que tienen con respecto a la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una delección, adición o sustitución de al menos un aminoácido, un truncado o una elongación, se prefieren. En el caso de una sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren las sustituciones en donde los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". La expresión "aminoácidos equivalentes" se dirige aquí a indicar cualquier aminoácido capaz de substituirse con uno de los aminoácidos de la estructura base, sin embargo, sin que modifique esencialmente las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y como se definirá posteriormente, en especial en los ejemplos. Estos aminoácidos equivalentes pueden determinar ya sea al basarse en su homología estructural con los aminoácidos que reemplazan, o a los resultados de pruebas comparativas de actividad biológica entre los diferentes anticuerpos capaces de llevarse a cabo.

A manera de ejemplo, se hace mención de las posibilidades de sustitución capaz de llevarse a cabo sin resultar en una modificación profunda de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente.

Como ejemplo no limitante, la siguiente tabla 1 da posibilidades de sustitución concebibles con una conservación de la actividad biológica del anticuerpo modificado. Las sustituciones inversas también por supuesto son posibles en las mismas condiciones.

TABLA 1

Residuo original	Substitución
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 que no están en su ambiente natural sino que deben ser capaces de aislarse u obtenerse por purificación de fuentes naturales, o de otra forma obtenerse por recombinación genética, o por análisis químicos, y que pueden entonces contener aminoácidos no naturales, como se describirá adicionalmente.

De acuerdo con un primer enfoque, el anticuerpo se definirá por su secuencia de cadena pesada. Más particularmente, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque comprende una cadena pesada que comprende cuando menos un CDR seleccionado de CDRs que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 1 a 9 y 56 a 58.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

- SEQ ID No. 1: GYIFTAYT
- SEQ ID No. 2: IKPNNGLA
- SEQ ID No. 3: ARSEITTEFDY
- SEQ ID No. 4: GYSFTDYT
- SEQ ID No. 5: INPYNGGT
- SEQ ID No. 6: AREEITKDFDF
- SEQ ID No. 7: GYTFTDYN
- SEQ ID No. 8: INPNNGGT
- SEQ ID No. 9: ARGRYVGYYYAMDY

SEQ ID No. 56: GYTFTSYW

SEQ ID No. 57: INPTTGST

SEQ ID No. 58: AIGGYGSWF AY

Las CDRs de la cadena pesada pueden seleccionarse al azar en las secuencias previas, es decir SEQ ID Nos. 1 a 9 y 56 a 58.

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 cuando menos un CDR seleccionado de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde:

- CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1, 4, 7 o 56,
- CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 2, 5, 8 o 57 y
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3, 6, 9 o 58.

De acuerdo con una primer modalidad del aspecto, el anticuerpo de la invención o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 2 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3.

Más particularmente, el anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales de acuerdo con esta primer modalidad, comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 18.

SEQ ID No. 18: EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYIFTAYTMHWVRQSLG
ESLDWIGGIKPNNGLANYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYY
CARSEITTEFDYWGGGTALT VSS

De acuerdo con una segunda modalidad del aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 4, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 5 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 6.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la segunda modalidad, de preferencia comprenderá una cadena

pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 19.

SEQ ID No. 19: EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTLNWWKQSH
GKTLEWIGLINPYNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVY
YCAREEITKDFDFWGQGTTTLTVSS

De acuerdo con una tercer modalidad del aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 7, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 8 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 9.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la tercera modalidad de preferencia comprenderá una cadena pesada de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 20.

SEQ ID No. 20: EVLLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTFTDYNMDWVKQSH
GMSLEWIGDINPNNGGTIFNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVY
CARGRYVGYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

De acuerdo con una cuarta modalidad del aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 56, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 57 y CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 58.

El anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales de acuerdo con la cuarta modalidad de preferencia comprenderá una cadena pesada de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 62.

SEQ ID No. 62:

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMNWWKQRPQGQLEWIGYI
NPTTGSTDYNQKLKDKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAIGGYGSW
FAYWGQGTLVTVSA

En un segundo enfoque, el anticuerpo ahora se definirá 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, se caracteriza porque comprende una cadena ligera que comprende al menos un CDR seleccionado de CDRs que comprende las secuencias aminoácidos SEQ ID Nos. 10 a 17 y 59 a 61.

Las secuencias mencionadas son las siguientes:

SEQ ID No. 10: ESVDSYANSF

SEQ ID No. 11: RAS

SEQ ID No. 12: QQSKEDPLT

SEQ ID No. 13: ESIDTYGNSF

SEQ ID No. 14: QQSNEDPFT

SEQ ID No. 15: ENIYSN

SEQ ID No. 16: AAT

SEQ ID No. 17: QHFWGPPYT

SEQ ID No. 59: SSVSSTY

SEQ ID No. 60: TTS

SEQ ID No. 61: HQWSSYPFT

Las CDRs de la cadena ligera pueden seleccionarse al azar en las secuencias previas, es decir SEQ ID Nos. 10 a 17 y 59 a 61.

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 al menos una CDR seleccionada de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde:

- CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 10, 13, 15 o 59,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 11, 16 o 60, y
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 12, 14, 17 o 61.

De acuerdo con una primer modalidad del otro aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 10, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 11 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 12.

Más particularmente, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con esta primera modalidad, comprende una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 21.

SEQ ID No. 21: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYANSFMHWYQQ
KPGQPPKLLIYRASNL ESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSKE

DPLTFGSGTKLEMK

De acuerdo con una segunda modalidad del otro aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 13, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 11 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 14.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la segunda modalidad de preferencia comprenderá una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 22.

SEQ ID No. 22: GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVSESIDTYGNSFIHWYQQKP
GQPPKLLIYRASNL ESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDSATYYCQQSNEDPF
TFGSGTKLEMK

De acuerdo con una tercer modalidad del otro aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 15, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 16 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 17.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la tercera modalidad, de preferencia comprenderá una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 23.

SEQ ID No. 23: DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKSP
QLLVYAATNLVDGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQHFHWGPPYTF
GGGTKLEIK

De acuerdo con una cuarta modalidad del otro aspecto, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 59, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 60 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 61.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la tercera modalidad, de preferencia comprenderá una cadena ligera de secuencias que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 63.

SEQ ID No. 63:

QIVLTQSPA IMSASPGEKVTLTCSASSSVSSTYLYWYQQKPGSSPKLWIYTT SIL

ASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMETEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLDIK

De acuerdo con un tercer enfoque, el anticuerpo ahora se definirá tanto por su secuencia de cadenas ligeras como su secuencia de cadenas pesadas. El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 18, 19, 20 ó 62 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 21, 22, 23 ó 63.

Más particularmente, un anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención, denominado 224G11, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácidos SEQ ID Nos. 1, 2 y 3; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID Nos. 10, 11 y 12.

En otro aspecto, el anticuerpo 224G11 comprende una comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 18 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 21.

Otro anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención, denominado 227H1, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 4, 5 y 6; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 13, 11 y 14.

En otro aspecto, el anticuerpo 227H1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 19 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 22.

Todavía otro anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, denominado 223C4, comprende una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 7, 8 y 9; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 15, 16 y 17.

En otro aspecto, el anticuerpo 223C4 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 20 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 23.

Todavía otro anticuerpo preferido, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales denominado 11E1, comprende una cadena pesada que

comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 56, 57 y 58; y una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, que comprende respectivamente las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos. 59, 60 y 61.

En otro aspecto, el anticuerpo 11E1 comprende una cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 62 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 63.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a hibridoma murino capaz de secretar anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención, en especial hibridoma de origen murino tal como el depositado en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM = Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) (Institut Pasteur, París, Francia).

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracterizan porque los anticuerpos son secretados por el hibridoma depositado en la CNCM en 03/14/2007 bajo los números CNCM 1-3724 (correspondiente a 11E1), 1-3731 (correspondiente a 224G11), 1-3732 (correspondiente a 227H1) y en 07/06/2007 bajo el número 1-3786 (correspondiente a 223C4). Estos hibridomas consisten de hibridoma murino que resulta en la fusión celular de esplenocitos de ratón inmunizado con una línea celular de mieloma (Sp20 Agl4).

La siguiente tabla 2 reagrupa elementos referentes a los anticuerpos preferidos.

TABLA 2

	224G11 1-3731		227H1 1-3732	
	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID
CDR-H1	1	24	4	27
CDR-H2	2	25	5	28
CDR-H3	3	26	6	29
Cadena H	18	41	19	42
CDR-L1	10	33	13	36
CDR-L2	11	34	11	34
CDR-L3	12	35	14	37
Cadena L	21	44	22	45

(Cont.)

	223C4 1-3786		11E1 1-3724	
	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID	Prot. SEQ ID	Nucl. SEQ ID
CDR-H1	7	30	56	64
CDR-H2	8	31	57	65
CDR-H3	9	32	58	66
Cadena H	20	43	62	70
CDR-L1	15	38	59	67
CDR-L2	16	39	60	68
CDR-L3	17	40	61	69
Cadena L	23	46	63	71

De la tabla 2, es claro que CDR-L2 de los anticuerpos 227H1 y 224G11 es similar. Este ejemplo claramente soporta las reivindicaciones de la presente solicitud que cubre anticuerpos que comprende al menos una CDR seleccionada al azar a través de las secuencias CDR descritas.

De acuerdo con una modalidad preferida, la invención se refiere a anticuerpos monoclonales.

El término "Anticuerpo Monoclonal" o se utiliza de acuerdo con su significado ordinario para denotar un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por mutaciones de origen natural posibles que pueden estar presentes en cantidades menores. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste en un anticuerpo homogéneo que resulta de la proliferación de un solo clon de células (por ejemplo, células de hibridoma, células hospederas eucarióticas transfectadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, células hospederas procarióticas transformadas con ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.), y que en general se caracteriza por cadenas pesadas de una sola clase y subclase, y cadenas ligeras de un solo tipo. Anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un solo antígeno. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes o epítope, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno.

En la presente descripción, los términos polipéptidos, secuencias polipéptido, secuencias de aminoácidos, péptidos y proteínas conectados a compuestos de anticuerpo o sus secuencias, son intercambiables.

De acuerdo con un aspecto igualmente particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, caracterizado porque el anticuerpo aún más comprende las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón, en especial humano, y en una forma preferida en que las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano, respectivamente son la región kappa y gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

En la presente solicitud, IgG1 se prefieren para obtener funciones efectoras y más preferiblemente ADCC y CDC.

La persona con destreza reconocerá que funciones efectoras incluyen por ejemplo enlace C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC = complement dependent cytotoxicity); enlace receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity); fagocitosis; y regulación a la baja de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de célula B; BCR).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, de preferencia son anticuerpos monoclonales específicos, en especial de origen murino, quimérico o humanizado, que pueden obtenerse de acuerdo con métodos estándar bien conocidos por la persona con destreza en la técnica.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos o derivados funcionales, en especial de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) o la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden obtenerse, por ejemplo a partir de células de animales inmunizadas contra c-Met, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo específicamente reconocido por los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención. c-Met o uno de sus fragmentos, puede producirse especialmente de acuerdo con los métodos de trabajo usuales, por recombinación genética partiendo con una secuencia de ácidos nucleicos contenida en la secuencia ADNc (cDNA) que codifica por c-Met o por síntesis de péptido partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia de péptido de c-Met.

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención, por

ejemplo pueden purificarse en una columna de afinidad en la que c-Met o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido específicamente por los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención, ha sido previamente inmovilizado. Más particularmente, los anticuerpos monoclonales pueden ser purificados por cromatografía en proteína A y/o G, seguido o no seguido por cromatografía de intercambio de iones dirigida a eliminar los contaminantes de proteína residuales así como ADN y los LPS, por sí mismos seguido o no seguido por cromatografía de exclusión en gel de Sepharose^{MR} a fin de eliminar los agregados potenciales debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una forma aún más preferida, todas estas técnicas pueden emplearse en forma simultánea o sucesiva.

Anticuerpos quiméricos o humanizados igualmente se incluyen en anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

Por anticuerpo quimérico, se pretende indicar un anticuerpo que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada), derivada de un anticuerpo de una especie determinada, en combinación con regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a la especie determinada (por ejemplo ratón, caballo, conejo, perro, vaca, pollo, etc.).

Los anticuerpos o sus fragmentos de tipo quimérico de acuerdo con la invención, pueden prepararse al utilizar las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede producirse al clonar 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 del anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de la invención codificado por este gen recombinante, por ejemplo será una quimera ratón-humano, la especificidad de este anticuerpo se determina 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 al documento Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988), Morrison et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6851-6855, 1984) o la patente de los E.U.A. No. 4,816,567.

Por anticuerpo humanizado, se pretende indicar un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, las otras partes de la molécula de anticuerpo se derivan de uno (o varios) anticuerpos

humanos. Aún más, algunos de los residuos de los segmentos del esqueleto (denominado FR) pueden modificarse a fin de conservar la afinidad del enlace (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Verhoeyen 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 por técnicas conocidas por la persona con destreza en la especialidad (tal como por ejemplo, aquellos descritos en los documentos de 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).

Otros métodos de humanización se conocen por la persona con destreza en la técnica, por ejemplo el método de "injerto de CDR" (CDR Grafting) 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 patentes de los E.U.A. Nos. 5,530,101, 6,180,370, 5,585,089 y 5,693,761. Las siguientes patentes también pueden mencionarse: 5,639,641; 6,054,297; 5,886,152 y 5,877,293.

Por "fragmento funcional" de un anticuerpo de acuerdo con la invención, se pretende indicar en particular un fragmento de anticuerpo, tal como Fv, scFv (sc para cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', fragmentos o diacuerpos scFv-Fc, o cualquier fragmento del cual el tiempo de vida media se ha incrementado por modificación química, tal como la adición de poli(alquilen) glicol tal como poli(etilen) glicol ("modificación con polietilen glicol o PEG-ilación") (fragmentos modificados con polietilen glicol denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" por Poli(Etilen) Glicol), o por incorporación en un liposoma, los fragmentos tienen al menos una de las CDRs características de las secuencias SEQ ID Nos. 1 a 17 y 56 a 61 de acuerdo con la invención, y en especial porque es capaz de ejercer de manera general, una actividad incluso parcial del anticuerpo del cual descende, tal como en particular la capacidad por reconocer y ligar a c-Met, y de ser necesario inhibir la actividad de c-Met.

De preferencia, los fragmentos funcionales estarán constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual se derivan, la secuencia parcial es suficiente para retener la misma especificidad de enlace que el anticuerpo del cual descende y una afinidad suficiente, de preferencia al menos igual a 1/100, en una forma más preferida de al menos 1/10, del anticuerpo del cual descende, con respecto a c-Met. Este

fragmento funcional contendrá como mínimo 5 aminoácidos de preferencia 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 50 y 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del cual desciende.

De preferencia, estos fragmentos funcionales serán fragmentos del tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que en general tienen la misma especificidad de enlace que el anticuerpo del cual descienden. En una modalidad más preferida de la invención, estos fragmentos se eligen entre fragmentos divalentes tales como fragmentos F(ab')₂. De acuerdo con la presente invención, fragmentos de anticuerpos de la invención pueden obtenerse partiendo de anticuerpos tal como se describió anteriormente por métodos tales como digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína y/o por rompimiento de los puentes disulfuro por reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención pueden obtenerse por técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por la persona con destreza en la técnica o de otra forma por síntesis de péptido mediante por ejemplo sintetizadores de péptido automáticos tales como aquellos suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc.

Por "fragmento divalente", habrá de entenderse cualesquiera fragmentos de anticuerpo que comprenden dos brazos y más particularmente fragmentos F(ab')₂.

Más particularmente, la invención comprende los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales de acuerdo con la presente invención, en especial anticuerpos quiméricos o humanizados, obtenidos por recombinación genética o por síntesis química.

Por "derivados" de un anticuerpo de acuerdo con la invención, se entiende una proteína de enlace que comprende un andamio o adaptador de proteína y al menos una de las CDRs seleccionadas del anticuerpo original, a fin de mantener la capacidad de enlace. Estos compuestos son bien conocidos por la persona con destreza en la técnica y se describirán con más detalle en la siguiente especificación.

Más particularmente, el anticuerpo o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención, se caracteriza porque dicho derivado consiste en una proteína de enlace que comprende un andamio o adaptador en el que al menos una CDR se ha insertado para la conservación de las propiedades de reconocimiento paratópicas del anticuerpo original.

Una o varias secuencias a través de las 6 secuencias CDR descritas

en la invención, pueden presentarse en un andamio o adaptador de proteína. En este caso, el andamio de proteína reproduce la estructura principal de proteína con plegado apropiado de las CDR(s) insertadas, de esta manera permitiéndole (o permitiéndoles) mantener sus propiedades de reconocimiento paratópicas de antígeno.

La persona con destreza en la técnica sabe como seleccionar el andamio de proteína en el que puede injertarse al menos una CDR seleccionada del anticuerpo original. Más particularmente, se conoce que, para seleccionarse, este andamio deberá exhibir varias características como sigue (Skerra A., J. Mol. Recogn., 13, 2000, 167-187):

- buena conservación filogenética,
- arquitectura robusta con una organización molecular tri-dimensional bien conocida (tal como por ejemplo, cristalografía o RMN),
- tamaño pequeño,
- sin o solo bajo grado de modificaciones post-traducción,
- fácil de producir, expresar y purificar.

Este andamio de proteína puede ser, pero sin limitación, una estructura seleccionada del grupo que consiste de fibronectina y de preferencia el décimo dominio tipo fibronectina III (FNfn10), lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), el derivado de proteína Z del dominio B de la proteína de estafilococo A, 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 armadillo", "repetición rica en leucina" o "repetición de tetratricopéptido".

También puede mencionarse derivado de andamio de toxinas (tal como por ejemplo, de toxinas de escorpión, de insectos, plantas o moluscos) o inhibidores de proteína de óxido nítrico sintasa neuronal (PIN).

Como un ejemplo no limitante de estas construcciones híbridas, puede mencionarse la inserción del CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, es decir el anticuerpo 13B8.2, en uno del bucle expuesto de PIN. Las propiedades de enlace de la proteína de enlace obtenida permanecen similares al anticuerpo original (Bes et al., BBRC 343, 2006, 334-344). También puede mencionarse el injerto de CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-lizozima VHH en un bucle de neocarzinostatina (Nicaise et al., 2004).

En el caso de la presente invención, una CDR interesante para conservar puede ser, sin limitación la CDR-L2 como se conserva en dos

anticuerpos identificados de la invención, es decir 227H1 y 224G11.

Como se mencionó anteriormente, este andamio de proteína puede comprender de 1 a 6 CDR(s) del anticuerpo original. En una modalidad preferida, pero sin limitación alguna, la persona con destreza en la técnica seleccionará al menos una CDR de la cadena pesada, la cadena pesada se conoce particularmente implicada en la especificidad de anticuerpo. La selección de las CDR(s) de interés será evidente para la persona con destreza en la técnica con métodos conocidos (BES et al, FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Como una evidencia, estos ejemplos no son limitativos y cualquier otro andamio conocido o descrito, deberá ser incluido en la presente especificación.

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

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

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de secuencias que consisten de:

- una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26 y las secuencias SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 34 y SEQ ID No. 35;

- una secuencia nucleico que comprende las secuencias SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 y las secuencias SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 34 y SEQ ID No. 37;

- una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 y las secuencias SEQ ID No. 38, SEQ ID No. 39 y SEQ ID No. 40; y

- una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEQ ID No. 64, SEQ ID No. 65, SEQ ID No. 66 y las secuencias SEQ ID No. 67, SEQ ID No. 68 y SEQ ID No. 69;

c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de secuencias que consisten de:

- una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEQ ID No. 41 y SEQ ID No. 44;

- una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEQ ID No. 42 y SEQ ID No. 45;

- una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEQ ID No. 43 y SEQ ID No. 46, y

- una secuencia nucleica que comprende las secuencias SEQ ID No. 70 y SEQ ID No. 71;

- d) los ácidos nucleicos ADN correspondientes de los ácidos nucleicos, como se define en b) o c);

- e) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos, como se define en a), b) y c); y

- f) un ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos capaz de hibridizar bajo condiciones de alta severidad con al menos una de las CDRs de las secuencias SEQ ID Nos. 24 a 40 y 64 a 69.

Por ácido nucleico, secuencia nucleica o de ácido nucleico, polinucleótido, oligonucleótido, secuencia de polinucleótidos, secuencia de nucleótidos, términos que se emplearán en forma indiferente en la presente invención, se pretende indicar un enlace de nucleótidos preciso que está o no modificado, permitiendo que se defina un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no contiene nucleótidos no naturales, y capaces de corresponder por igual a un ADN de doble hebra, un ADN de hebra sencilla a los productos de transcripción de los ADNs.

También habrá de entenderse aquí que la presente invención no se refiere a secuencias nucleótidas en su ambiente cromosomal natural, es decir en el estado natural. Se refiere a secuencias que se han aislado y/o purificado, es decir, que se han seleccionado en forma directa o indirecta por ejemplo por copia, su ambiente ha sido al menos parcialmente modificado. De esta manera igualmente se pretende que indique aquí los ácidos nucleicos aislados obtenidos por recombinación genética, por ejemplo mediante células hospederas obtenidas por síntesis química.

Una hibridización bajo condiciones de alta severidad, significa que se eligen las condiciones de temperatura y concentración iónica de manera tal que permitan el mantenimiento de la hibridización entre dos fragmentos de ADN complementario. A manera de ilustración, las condiciones de alta severidad de la etapa de hibridización para propósitos de definir los fragmentos polinucleótidos descritos anteriormente, son ventajosamente las siguientes.

La hibridización ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridización a 42 grados C por 3 horas en amortiguador fosfato (20 mM, pH 7.5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC que corresponde a una solución de

NaCl 0.15 M + citrato de sodio 0.015 M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10 x Denhardt, 5% de dextran sulfato y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridización actual por 20 horas a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42 grados C, para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos) seguido por 2 lavados de 20 minutos a 20 grados C en 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20 grados 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 por 30 minutos a 60 grados C para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridización de alta severidad descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido, pueden adaptarse por la persona con destreza 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 igualmente se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La invención se dirige especialmente a vectores de expresión y/o clonación que contienen una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención.

Los vectores de acuerdo con la invención de preferencia contienen elementos que permiten la expresión y/o secreción de las secuencias de nucleótidos en una célula hospedera determinada. El vector por lo tanto debe contener un promotor, señales de inicio y terminación de traducción, así como regiones apropiadas de regulación de transcripción. Debe ser capaz de mantenerse en una forma estable en la célula hospedera y opcionalmente tener señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos se eligen y optimizan por la persona con destreza en la técnica, como una función de la célula hospedera empleada. Para este efecto, las secuencias de nucleótido de acuerdo con la invención pueden insertarse en vectores de replicación autónomos en el hospedero selecto o ser vectores integrales del hospedero selecto.

Estos vectores se preparan por métodos actualmente empleados por la persona con destreza en la técnica, y los clones resultantes pueden introducirse en un hospedero apropiado por métodos estándar, tales como lipofección, electroporación, choque térmico, o métodos químicos.

Los vectores de acuerdo con la invención por ejemplo son, vectores de origen plásmido o viral. Son útiles para transformar células hospederas a fin de

clonar o expresar las secuencias de nucleótido de acuerdo con la invención.

La invención igualmente comprende las células hospederas transformadas por o que comprenden un vector de acuerdo con la invención.

La célula hospedera puede seleccionarse de sistemas procarióticos o eucarióticos, por ejemplo células bacterianas pero igualmente células de levadura o células de animales, en particular células de mamífero. Igualmente es posible utilizar células de insecto o células de plantas.

La invención igualmente se refiere a animales, excepto humanos, que comprenden al menos una célula transformada de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otro aspecto, un objeto de la invención es un proceso para 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 hospedera de acuerdo con la invención; y

b) la recuperación de los anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos de esta manera, partiendo del medio de cultivo o las células cultivadas.

Las células transformadas de acuerdo con la invención pueden utilizarse en procesos para preparación de polipéptidos recombinantes de acuerdo con la invención. Los procesos para preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención, en forma recombinante, se caracterizan porque emplean un vector y/o una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, los mismos son comprendidos en la presente invención. De preferencia, se recupera una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido y el péptido recombinante.

Como se ha dicho, la célula hospedera puede seleccionarse de sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar secuencias nucleótido de acuerdo con la invención, facilitando la secreción en dicho sistema procariótico o eucariótico. Un vector de acuerdo con invención que transporta dicha secuencia, por lo tanto puede ser empleado ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes, pretendidas para secretarse. En efecto, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se facilitará por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular en vez de en el interior de las células hospederas.

Igualmente es posible preparar los polipéptidos de acuerdo con la

invención por síntesis química. Este proceso de preparación igualmente es un objeto de la invención. La persona con destreza 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, 2nd ed., (1984)] o técnicas que utilizan fases sólidas parciales, al condensar fragmentos o por síntesis clásica en solución. Los polipéptidos obtenidos por síntesis química y capaces de contener aminoácidos no naturales correspondientes, igualmente están comprendidos en la invención.

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

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

La invención igualmente se refiere a una composición farmacéutica que comprende a manera de principio activo, un compuesto que consiste de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención, de preferencia en mezcla con un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otra modalidad complementaria de la invención consiste en una composición tal como se describió anteriormente, que comprende aún más, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un anticuerpo anti-tumoral.

Más preferiblemente, el segundo anticuerpo anti-tumoral puede seleccionarse a través de anti-IGF-IR, anti-EGFR, anti-HER2/neu, anti-VEGFR, anti-VEGF, etc., anticuerpos o cualesquiera otros anticuerpos anti-tumorales conocidos por la persona con destreza en la especialidad. Es evidente que el uso, como segundo anticuerpo, de fragmentos o derivados funcionales de los anticuerpos anteriormente mencionados, es parte de la invención.

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

"Uso simultáneo" se entiende que significa la administración de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención es una forma farmacéutica sencilla e idéntica.

"Uso 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 secuencial" 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.

De manera general, la composición de acuerdo con la invención aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento de cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-c-Met de acuerdo con la invención, se potencia de manera inesperada por la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja subsecuente mayor producida por una composición de acuerdo con la invención, se refiere a la posibilidad de utilizar dosis eficaces inferiores de principio activo, que permiten evitar o reducir los riesgos de aparición de efectos secundarios, en particular los efectos de agente citotóxico.

Además, esta composición de acuerdo con la invención permitirá que se alcance más rápidamente el efecto terapéutico esperado.

La composición de la invención también puede caracterizarse porque comprende, aún más, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un agente citotóxico/citostático.

Por "agentes terapéuticos anti-cáncer" o "agentes citotóxicos/citostáticos", se pretende una sustancia que cuando se administra a un sujeto, trata o evita el desarrollo de cáncer en el cuerpo del sujeto. Como ejemplos no limitantes de estos agentes, pueden mencionarse agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos anti-tumor, inhibidores mitóticos, inhibidores de función de cromatina, agentes anti-angiogénesis, anti-estrógenos, anti-andrógenos o inmunomoduladores.

Estos agentes por ejemplo se citan en la edición 2001 de VIDAL, en la página dedicada a los compuestos agregados a la columna de cancerología y hematología "Citotóxicos" (Citotoxics), estos compuestos citotóxicos citados con referencia a este documento, se mencionan aquí como agentes citotóxicos preferidos.

Más particularmente, los siguientes agentes se prefieren de acuerdo con la invención.

"Agente alquilante" se refiere a cualquier sustancia que puede entrelazar o alquilar cualquier molécula, de preferencia ácido nucleico (por ejemplo, ADN), dentro de una célula. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen mostaza de nitrógeno, tales como mecloretamina, clorambucol, melfalán, clorhidrato, pipobromen, prednimustina, fosfato disódico o estramustina; oxazoforinas tales como ciclofosfamida, altretamina, trofosfamida, sulfofosfamida o

ifosfamida; aziridinas o imino-etilenos tales como tiotepa, trietilenamina o altetramina; nitrosourea tal como carmustina, estreptozocina, fotemustina o lomustina; alquil-sulfonatos tales como busulfan, treosulfan o improsulfan; triazenos tales como dacarbazina; o complejos de platino tales como cis-platino, oxaliplatina y carboplatina.

"Anti-metabolitos" se refieren a sustancias que bloquean el crecimiento celular y/o metabolismo, al interferir con ciertas actividades, usualmente síntesis de ADN. Ejemplos de antimetabolitos incluyen metotrexato, 5-fluoruracilo, floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina, capecitabina, citarabina, fludarabina, citosina arabinosida, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG), clorodesoxiadenosina, 5-azacitidina, gemcitabina, cladribina, deoxicoformicina y pentostatina.

"Antibióticos anti-tumor" se refieren a compuestos que pueden evitar o inhibir síntesis de ADN, ARN y/o de proteínas. Ejemplos de antibióticos anti-tumor incluyen doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona, dactinomicina, mitramicina, plicamicina, mitomicina C, bleomicina y procarbazona.

"Inhibidores mitóticos" evitan avance normal del ciclo celular y mitosis. En general, inhibidores de microtúbulos o taxoides tales como paclitaxel y docetaxel, son capaces de inhibir la mitosis. Vinca alcaloides tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina también son capaces de inhibir la mitosis.

"Inhibidores de función de cromatina" o "inhibidores de topoisomerasa" se refieren a sustancias que inhiben la función normal de proteínas que modelan cromatina tales como topoisomerasa I o topoisomerasa II. Ejemplos de inhibidores de función de cromatina incluyen para topoisomerasa I, camptotecina y sus derivados tales como topotecan o irinotecan, y para topoisomerasa II, etopósido, etopósido fosfato y tenipósido.

"Agente anti-angiogénesis" se refiere a cualquier droga, compuesto, sustancia o agente que inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos. Agentes anti-angiogénesis incluyen, pero de ninguna manera están limitados 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, interferona-alfa, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina y vitaxina.

"Anti-estrógeno" o "agente anti-estrogénico" se refiere a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de estrógeno. Ejemplos de

agentes anti-estrógenos son tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, yodoxifeno, anastrozol, letrozol y exemestano.

"Anti-andrógenos" o "agentes anti-andrógenos" se refieren a cualquier sustancia que reduce, antagoniza o inhibe la acción de un andrógeno. Ejemplos de anti-andrógenos son flutamida, nilutamida, bicalutamida, esprironolactona, ciproterona acetato, finasterida y cimitidina.

"Inmunomoduladores" son sustancias que estimulan el sistema inmune.

Ejemplos de inmunomoduladores incluyen interferona, interleucina tales como aldesleucina, OCT-43, denileucina diflitox e interleucina-2, factores de necrosis tumoral tales como tasonermina u otros inmunomoduladores tales como lentinano, sizofirano, roquinimex, pidotimod, pegademase, timopentina, ácido poliinosínico-policitidílico (poly I:C) o levamisol en conjunto con 5- fluorouracilo.

Para más detalle, la persona con destreza en la técnica puede referirse al manual editado por la "Association Francaise des Enseignants de Chimie Therapeutique" y con título "traite de chimie therapeutique, vol. 6, Medicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers, edición TEC & DOC, 2003".

También puede mencionarse como agentes químicos o agentes citotóxicos, todos los inhibidores de cinasa tales como por ejemplo, gefitinib o erlotinib.

En una modalidad particularmente preferida, dicha composición como un producto de combinación de acuerdo con la invención, se caracteriza porque el agente citotóxico se acopla químicamente al anticuerpo para uso simultáneo.

A fin de facilitar el acoplamiento entre el agente citotóxico y el anticuerpo de acuerdo con la invención, es especialmente posible introducir moléculas espaciadoras entre los dos compuestos a acoplar, tales como poli(alquilen) glicoles como polietilen glicol, o de otra forma aminoácidos o en otra modalidad, utilizar derivados activos de los agentes citotóxicos en los que se hubieran introducido funciones capaces de reaccionar con el anticuerpo de acuerdo con la invención. Estas técnicas de acoplamiento son bien conocidos por la persona con destreza en la especialidad y no serán expandidas en la presente descripción.

La invención se refiere en otro aspecto, a una composición caracterizada porque uno, al menos de los anticuerpos, o uno de sus fragmentos o

derivados funcionales se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.

De preferencia, la toxina o el radioelemento es capaz de inhibir al menos una actividad celular de células que expresan c-Met, en una forma más preferida capaz de evitar el crecimiento o la proliferación de la célula, especialmente de inactivar totalmente la célula.

También de preferencia, la toxina es una toxina enterobacteriana, en especial la exotoxina pseudomonas A.

Los radioelementos (o radioisótopos) de preferencia conjugados con los anticuerpos empleados para la terapia, son radioisótopos que emiten rayos gamma y de preferencia yodo¹³¹, itrio, oro¹⁹⁹, paladio¹⁰⁰, cobre⁶⁷, bismuto²¹⁷ y antimonio²¹¹. Los radioisótopos que emiten rayos beta y alfa igualmente pueden emplearse para la terapia.

Por toxina o radioelemento conjugado con al menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención, se pretende indicar cualesquiera medios que permitan que la toxina o el radioelemento ligue al anticuerpo como mínimo, en especial por acoplamiento covalente entre los dos compuestos, con o sin introducción de una molécula de enlace.

Entre los agentes que permiten enlace en una forma química (covalente), electrostática o no covalente de todo o parte de los componentes del conjugado, puede hacerse particularmente mención de benzoquinona, carbodiimida y más particularmente EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida), dimaleimida, ácido ditiobis- nitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil S-acetil tio-acetato (SATA), los agentes fuente que tienen uno o más grupos fenilazida que reaccionan con los ultravioletas (U.V.) y de preferencia N-[4-(azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 6-hidrazino-nicotinamida (HYNIC).

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

Entre estos quelatos, es posible mencionar los quelatos derivados de EDTA (ácido etilendiamintetraacético) o de DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético) que se han desarrollado para ligar metales, en especial metales radioactivos, e inmunoglobulinas. De esta manera, DTPA y sus derivados pueden sustituirse por diferentes grupos en la cadena de carbonos, a fin de incrementar la estabilidad y la rigidez del complejo ligando-metal (Krejcarek et al. (1977); Brechbiel et al. (1991); Gansow (1991); patente de los E.U.A. No. 4,831,175).

Por ejemplo el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y sus derivados, que se han empleado ampliamente en medicina y en biología por largo tiempo, ya sea en su forma libre o en la forma de un complejo con un ión metálico, tiene la característica notable de formar quelatos estables con iones metálicos y para acoplarse con proteínas de interés terapéutico o de diagnóstico tales como anticuerpos para el desarrollo de radioinmunoconjugados en terapia de cáncer (Meases et al., (1984); Gansow et al. (1990)).

Igualmente de preferencia, el anticuerpo como mínimo que forma el conjugado de acuerdo con la invención, se selecciona de sus fragmentos funcionales, en especial los fragmentos amputados de su componente Fc tales como los fragmentos scFv.

Como ya se mencionó, en una modalidad preferida de la invención, el agente citotóxico/citostático o la toxina y/o un radioelemento, se acopla químicamente al menos uno de los elementos de la composición para uso simultáneo.

La presente invención comprende la composición descrita como un medicamento.

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

En otro aspecto, la invención trata con el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, y/o una composición como se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento pretendido para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células de tumor.

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, como se describió anteriormente o el uso anteriormente mencionado, para la preparación de un medicamento pretendido para la prevención o para el tratamiento de cáncer.

También la presente invención comprende un método pretendido para inhibir el crecimiento y/o proliferación de células de tumor en un paciente, que comprende la administración a un paciente que lo requiere, de un anticuerpo, o 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 además comprende un método para la prevención o tratamiento de cáncer en un paciente que lo requiere, que comprende la administración al paciente de un anticuerpo, o 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 particular preferido, el cáncer es un cáncer seleccionado de cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer endometrial, glioblastoma o cáncer de colon.

Como se explicó anteriormente, una ventaja de la invención es permitir el tratamiento de cánceres relacionados a activación de Met dependiente e independiente de HGF.

La invención, todavía en otro aspecto, abarca un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobre-expresión o una sub-expresión del receptor c-Met partiendo de una muestra biológica en donde la presencia normal del receptor c-Met se sospecha, el método se caracteriza porque comprende la etapa en donde la muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo de la invención, siendo posible que el anticuerpo de ser necesario, esté etiquetado.

De preferencia, las enfermedades conectadas con la presencia anormal del receptor c-Met en el método de diagnóstico, serán cánceres.

El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, puede estar presente en la forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo etiquetado para 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, que pueden conjugarse, por ejemplo con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato dehidrogenasa o glucosa 6-fosfato dehidrogenasa o por una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromodeoxiuridina. Etiquetas fluorescentes igualmente pueden conjugarse en los anticuerpos o sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención y en especial incluyen fluoresceína y sus derivados, fluorógeno, rodamina y sus derivados, Proteína Fluorescente Verde (GFP = "Green Fluorescent Protein"), dansil, umbeliferona, etc. En estos conjugados, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos funcionales pueden prepararse por métodos conocidos por la persona con destreza en la especialidad. Pueden acoplarse a las enzimas o a las etiquetas fluorescentes directamente o por intermedio de un grupo espaciador o de un grupo de enlace tal como un

polialdehído, como glutaraldehído, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido dietilen-triaminopentaacético (DTPA), o en la presencia de agentes de acoplamiento tales como aquellos mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Los conjugados contienen etiquetas de tipo fluoresceína, pueden prepararse por reacción con un isotiocianato.

Otros conjugados igualmente pueden incluir etiquetas químico luminiscentes tales como luminol y los dioxetanos, etiquetas bio-luminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o de otra forma etiquetas radioactivas 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 la persona con destreza en la técnica, existentes para acoplar los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos, ya sea directamente o por un agente quelante tal como EDTA, DTPA anteriormente mencionados, pueden emplearse para los radioelementos que pueden utilizarse en diagnóstico. Igualmente es posible mencionar etiquetado con Na[I¹²⁵] por el método de cloramina T [Hunter W.M. and Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495] o de otra forma con tecnecio^{99m} por la técnica de Crockford et al. (patente de los E.U.A. No. 4,424,200) o enlazado mediante DTPA como se describe por Hnatowich (patente de los E.U.A. No. 4,479,930).

De esta manera, los anticuerpos o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, pueden emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobre-expresión o de una sub-expresión, de preferencia una sobre-expresión del receptor c-Met en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) el contacto de la muestra biológica con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención; y
- b) la demostración del complejo c-Met/anticuerpo posiblemente formado.

En una modalidad particular, los anticuerpos o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, pueden emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación del receptor c-Met en una muestra biológica, para la supervisión de la eficacia de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer dependiente de c-Met.

Más generalmente, los anticuerpos o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención pueden emplearse ventajosamente en cualquier

situación en donde debe observarse la expresión del receptor c-Met en una forma cualitativa y/o cuantitativa.

De preferencia, la muestra biológica se forma por un fluido biológico, tal como suero, sangre entera, células, una muestra de tejido o biopsias de origen humano.

Cualquier procedimiento o prueba convencional puede emplearse a fin de llevar a cabo esta detección y/o dosis. La prueba puede ser una prueba de competencia o de emparejado, o cualquier prueba conocida por la persona con destreza en la técnica dependiente de la formación de un complejo inmune de tipo anticuerpo-antígeno. Siguiendo las aplicaciones de acuerdo con la invención, el anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, puede ser inmovilizado o etiquetado. Esta inmovilización puede llevarse a cabo en numerosos soportes conocidos por la persona con destreza en la técnica. Estos soportes pueden incluir especialmente vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon o células naturales o modificadas. Estos soportes ya pueden ser solubles o insolubles.

A manera de ejemplo, un método preferido pone en juego procesos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA, por inmunofluorescencia o técnica de radioinmunoensayo (RIA) o equivalente.

De esta manera, la presente invención igualmente comprende los equipos o conjuntos necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducido por una sobre-expresión o una sub-expresión del receptor c-Met o para llevar a cabo un proceso para la detección y/o cuantificación de una sobre-expresión o de una sub-expresión del receptor c-Met en una muestra biológica, de preferencia una sobre-expresión del receptor, caracterizado porque el equipo o conjunto comprende los siguientes elementos:

a) un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención;

b) opcionalmente, los reactivos para la formación del medio favorable para la reacción inmunológica;

c) opcionalmente, los reactivos que permiten la demostración de complejos c-Met/anticuerpo producidos por la reacción inmunológica.

Un objeto de la invención igualmente es el uso de un anticuerpo o una composición de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento pretendido para el blanco específico de un compuesto biológicamente activo a células que expresan o sobre-expresan el receptor c-Met.

Aquí se pretende por compuestos biológicamente activo el indicar cualquier compuesto capaz de modular, en especial de inhibir, actividad celular, en particular su crecimiento, su proliferación, transcripción o traducción de genes.

Un objeto de la invención también es un reactivo de diagnóstico *in vivo*, que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, de preferencia etiquetado, especialmente radioetiquetado, y su uso en formación de imagen médica, en particular para la detección de cáncer conectado con la expresión o la sobre-expresión por una célula del receptor c-Met.

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

De preferencia, la composición, como un producto de combinación del conjugado de acuerdo con la invención se mezclará con un excipiente y/o un vehículo farmacéutico aceptable.

En la presente descripción, vehículo farmacéuticamente aceptable se pretende que indique un compuesto o combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo facilitar la administración del o de los compuestos activos, un aumento en su extensión de vida útil y/o su eficacia en el cuerpo, un aumento en su solubilidad en solución o de otra forma una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por la persona con destreza en la técnica como una función de la naturaleza y del modo de administración del o de los compuestos activos selectos.

De preferencia, estos compuestos se administrarán por la ruta sistémica, en particular por 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 se administrará varias veces, en una forma secuencial.

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

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

Figura 1: Ejemplos de perfiles FACS de los anticuerpos anti-c-Met selectos;

Figuras 2A y 2B: Inhibición *in vitro* de proliferación BXPC3 por anticuerpos que hacen blanco en c-Met;

Figura 3: Inhibición de dimerización de c-Met;

Figura 4: Reconocimiento de proteína por anticuerpos anti-c-Met;

Figuras 5A y 5B: "Cartografía de epítotope" de 11E1 y 5D5 por análisis BIAcore;

Figuras 6A y 6B: Efecto de MAbs en fosforilación de c-Met;

Figuras 7A y 7B: Desplazamiento de HGF radio-etiquetado por anticuerpos anti-c-Met;

Figura 8: Inhibición de invasión por anticuerpos anti-c-Met [en esta figura, SVF significa suero bovino fetal (FCS = means Fetal Calf Serum)];

Figura 9: Efecto de anticuerpos anti c-Met en sanado de heridas;

Figuras 10A y 10B: Ensayo de dispersión;

Figura 11: Ensayo de tubulogénesis tri-dimensional;

Figuras 12A y 12B: Efecto de anticuerpos en formación de esferoide;

Figura 13: Actividad *in vivo* de Mabs anti-c-Met en el modelo de xenoinjerto U87MG;

Figura 14: Expresión HGF por un conjunto de líneas celulares de tumor;

Figuras 15A y 15B: Caracterización de línea celular NCI-H441; con la Figura 15A que corresponde al análisis RT-PCR cuantitativo y la Figura 15B que corresponde a análisis FACS;

Figura 16: Actividad *in vivo* de anticuerpos anti-c-Met en modelo de xenoinjerto NCI-H441;

Figura 17A: Alineamiento de 224G11 VL con gen de célula germinal IGKV3-5*01 murina;

Figura 17B: Alineamiento de 224G11 VL con genes de células germinales IGKJ4*01 murina;

Figura 18A: Alineamiento de 224G11 VL con genes de células germinales IGKV3-11*01 y IGKV4-1*01 humanas;

Figura 18B: Alineamiento de 224G11 VL con gen de células germinales IGKJ4*02 humanas;

Figura 19A: IGKV3-11*01 versión humanizada basada en 224G11 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 19B: IGKV4-1*01 versión humanizada basada en 224G11 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 20A: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHV1-18*01 murinas;

Figura 20B: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHD2-4*01 murinas;

Figura 20C: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHJ2*01 murinas;

Figura 21A: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHV1-2*02 humanas;

Figura 21B: Alineamiento de 224G11 VH con gen de células germinales IGHJ4*01 humanas;

Figura 22: 224G11 VH humanizado con mutaciones mencionadas 224G11 VH;

Figura 23A: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKV3-5*01 murinas;

Figura 23B: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKJ4*01 murinas;

Figura 24A: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKV3-11*01 y IGKV4-1*01 humanas;

Figura 24B: Alineamiento de 227H1 VL con gen de células germinales IGKJ4*02 humanas;

Figura 25A: Versión humanizada basada en IGKV3-11*01 de 227H1 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 25B: versión humanizada basada en IGKV4-1*01 de 227H1 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 26A: Alineamiento de 227H1 VH con gen de células germinales IGHV1-18*01 murinas;

Figura 26B: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHD1-1*02 murinas;

Figura 26C: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHJ2*01 murinas;

Figura 27A: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHV1-2*02 humanas;

Figura 27B: Alineamiento de 227H1 VH con un gen de células germinales IGHJ4*01 humanas;

Figura 28: Humanizado 227H1 VH con mutaciones mencionadas;

Figura 29A: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKV12-46*01 murinas;

Figura 29B: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKJ2*01 murinas;

Figura 30A: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKV1-NL1*01 humana;

Figura 30B: Alineamiento de 223C4 VL con un gen de células germinales IGKJ2*01 humana;

Figura 31: 223C4 VL humanizado con mutaciones mencionadas;

Figura 32A: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHV1-18*01 murinas;

Figura 32B: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHD6-3*01 murinas;

Figura 32C: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHJ4*01 murinas;

Figura 33A: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHV1-2*02 humanas;

Figura 33B: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHD1-26*01 humanas;

Figura 33C: Alineamiento de 223C4 VH con un gen de células germinales IGHJ6*01 humanas; y

Figura 34: 223C4 VH humanizado con mutaciones mencionadas;

Figura 35: Actividad anti-tumor de 224G11 Mab murino solo o combinado con Navelbine® en el modelo de tumor NCI-H441 de xenoinjerto establecido;

Figura 36: Evaluación de Mabs anti-c-Met en proliferación de HUVEC;

Figura 37: Evaluación de Mabs anti-c-Met en formación de tubo HUVEC;

Figura 38A: Alineamiento de 11E1 VL con gen de células germinales IGKV4-79*01 murinas;

Figura 38B: Alineamiento de 11E1 VL con un gen de células germinales IGKJ4*01 murinas;

Figura 39A: Alineamiento de 11E1 VL con un gen de células germinales IGKV3D-7*01 humanas;

Figura 39B: Alineamiento de 11E1 VL con un gen de células germinales IGKJ4*02 humanas;

Figura 40: Versión humanizada de 11E1 VL con mutaciones mencionadas;

Figura 41A: Alineamiento de 11E1 VH con gen de células germinales IGHV1-7*01 murinas;

Figura 41B: Alineamiento de 11E1 VH con gen de células germinales IGHD4-I*01 murinas;

Figura 41C: Alineamiento de 11E1 VH con gen de células germinales IGHJ3*01 murinas;

Figura 42A: Alineamiento de 11E1 VH con genes de células germinales IGHV1-2*02 y IGHV1-46*01 humanas;

Figura 42B: Alineamiento de 11E1 VH con un gen de células germinales IGHJ4*03 humanas;

Figura 43: 11E1 VH humanizado con mutaciones mencionadas;

Figuras 44A y 44B: Ensayo de fosforilación c-Met en células A549. Evaluación de Mabs purificados 11E1 y 224G11, en ausencia o en presencia de HGF, ya sea a 30 µg/ml (Figura 44A) o dentro de un intervalo de dosis de 0.0015 a 30 µg/ml a fin de determinar valores EC_{50} (Figura 44B);

Figura 45: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Navelbine® en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figura 46: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Doxorubicina en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figura 47: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Docetaxel en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figura 48: Combinación *in vivo* de 224G11 Mab con Temozolomida en el modelo de xenoinjerto NSCLC NCI-H441;

Figuras 49A, 49B, 49C y 49D: Efecto de Mabs anti-c-Met en crecimiento de esferoide U87-MG;

Figuras 50A y 50B: Actividad *in vitro* de formas quimérica y humanizada de 224G11 en el ensayo fosfo-c-Met;

Figura 51: Ajustes de análisis Biacore;

Figura 52: Actividad *in vivo* de 224G11 en células MDA-MB-231 co-implantadas con células MRC5 como fuente HGF humana en ratones desnudos Atímicos;

Figura 53: Ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet. Actividad

de enlace Anti-Fc-c-Met se mide en un ensayo basado en ELISA, en donde conjugados anti-murinos Fc se utilizan para detectar los anticuerpos monoclonales murinos purificados 11E1, 224G11 y 227H1. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico se miden a 450 nm;

Figura 54: Ensayo de competencia HGF-cMet. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMET recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de anticuerpos monoclonales murinos purificados 11E1, 224G11 y 227H1 se detecta con conjugado FC anti-murino y mide a 450 nm;

Figura 55: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominio VH recombinante derivados de 227H1. La secuencia de aminoácidos 227H1 VH se alinea con las secuencias marco receptoras humanas seleccionadas, con solo mencionados de los aminoácidos que se encontraron diferentes de la secuencia 227H1 VH murina. Secuencias 227H1 HZ1, HZ2 y HZ3 VH corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio VH murino 227H1, con residuos murino restantes con negritas. En HZ3, 10 residuos (*) se cambiaron automáticamente por sus contras partes humanas. En HZ2, los siete residuos del tercer grupo (3) se han estudiado. En HZ1VH, los nueve residuos del segundo grupo (2) se han mutado en sus contra-partes humanas, solo los seis residuos del primer grupo (1) permanecen murinos;

Figura 56: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 227H1 recombinantes. La actividad de enlace anti-Fc-cMet se midió en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se midieron en el ensayo basado en ELISA en donde Fc anti-humano se emplearon para detectar anticuerpos recombinantes derivados 227-H1 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 227H1 derivado de dominios VH humanizados, se midieron a 450 nm y después compararon con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 57: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos derivados 227H1-recombinantes. La actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humanos se emplean para detectar anticuerpos recombinantes derivados 227-H1 quiméricos y humanizados. La actividad de enlace dependiente de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpo 227H1 derivado HZ4VH humanizado se midió a 450 nm y después comparó con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 58: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 227H1. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de las diferentes formas del anticuerpo 227H1, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 227H1 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 227H1 humanizados derivados de HZ4VH y quiméricos se probaron y compararon por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se mide a 450 nm;

Figura 59: secuencia de dominio variable humanizado 227H1-HZ VH. *, corresponde a aminoácidos cambiados de facto a sus contrapartes humanas; !, corresponde a aminoácidos humanizados durante la implementación HZ3 a HZ1; §, corresponde a aminoácidos humanizados en la secuencia 227H1-HZ VH final;

Figura 60: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominios VH recombinantes derivados de 11E1. La secuencia de aminoácidos 11E1 VH se alinea con la secuencia marco receptora humana seleccionada, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 11E1 VH murina. Secuencias 11E1 HZ VH1, VH2 y VH3 corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio VH murino 11E1, con residuos murinos restantes en negritas. En HZ VH3, siete residuos (*) se cambiaron automáticamente por sus contrapartes humanas. En HZ VH2, los siete residuos del tercer grupo (3) se han estudiado. En HZ VH1, los cinco residuos del segundo grupo (2) se han mutado a sus contrapartes humanas, solo los cinco residuos del primer grupo (1) permanecen murinos;

Figura 61: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 11E1 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se midió en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humanos se emplearon para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 11E1 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis sobre Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 11E1 derivados de dominios VH humanizados se midieron a 450 nm y después compararon con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 62: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de dominios de VL recombinantes derivados de 11E1. La secuencia de aminoácidos 11E1 VL se alinea con la secuencia marco receptora humana seleccionada, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 11E1 VL murina. Secuencias 11E1 HZ VL1, VL2 y VL3 corresponden a versiones

humanizadas implementadas del dominio VL murino 11E1, con residuos murinos restantes en negritas. En HZ VL3, diez residuos (*) se cambiaron automáticamente por sus contrapartes humanas. En HZ VL2, los ocho residuos del tercer grupo (3) se han estudiado. En HZ VL1, los ocho residuos del segundo grupo (2) se han mutado a sus contrapartes humanas, solo los cuatro residuos del primer grupo (1) permanecen murinos;

Figura 63: ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet de anticuerpos 11E1 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humanos se emplean para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 11E1 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis sobre Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 11E1 derivados de dominios VL humanizados, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico a referencia/paternal;

Figura 64: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 11E1 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se midió en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se emplean para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 11E1 humanizados y quiméricos. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 11E1 derivados de dominios humanizados dobles se miden a 450 nm y después comparan con aquellas del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 65: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de secuencia de dominio 224G11 VH. La secuencia aminoácidos 224G11 VH se alinea con la secuencia de 227H1 VH (subrayados son residuos no homólogos) y con la secuencia marco receptora humana selecta, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 224G11 VH murina. La secuencia 224G11 HZ VH0 corresponde a la versión humanizada "IMGT completa/basada en 227H1" del dominio VH murino 224G11. En esta secuencia, ningún residuo externo-IMGT-CDRs permanece murino;

Figura 66: ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se emplearon para detectar anticuerpos recombinantes derivados 224G11 humanizados derivados de HZVH0 y quiméricos. Actividad de enlace dependiente de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico del anticuerpo 224G11 derivado de

VH11 humanizado HZVH0 "IMGT completo" se midió a 224G11 después comparó con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 67: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante a HGF revestido con plástico en la presencia de formas diferentes del anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 224G11 humanizados derivados de HZVH0 y quiméricos se probaron y compararan por sus capacidades para competir con enlace HGF-cMet cuando se miden a 450 nm;

Figura 68: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de secuencia de dominio 224G11 VL. La secuencia de aminoácidos 24G11 VL se alinea con las dos secuencias de marco receptor humano selectas, con solo los aminoácidos mencionados que se encontraron diferentes de la secuencia 224G11 VL murina. La secuencia 224G11 HZ VL3 corresponde a la versión humanizada "CDR1 más corto" del dominio VH murino 224G11 mientras que HZ VL6 corresponde a la versión "CDR1 más largo", con los residuos murinos restantes con negritas. Para ambas versiones humanizadas básicas, los residuos murino restantes están clasificados para adicional proceso de humanización en donde * corresponde a aminoácidos en las versiones básicas y 3, 2 y 1 corresponden a los grupos de residuos para el diseño de las versiones humanizadas implementadas;

Figura 69: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. La actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados 22G11 humanizados y quiméricos. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 224G11 derivados de dominios VL3 y VL6 humanizados, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 70: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humanos se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados 224G11 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 224G11 derivados de dominios VL humanizados se miden a 450 nm y después comparan con aquellos

del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 71: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante a HGF revestido con plástico en la presencia de las formas diferentes del anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 224G11 humanizados derivados de HZVL4 y quiméricos, se probaron y compararan por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se miden a 450 nm;

Figura 72: Secuencias de aminoácidos de la secuencia de dominio 224G11 VL. *, corresponde a aminoácidos cambiados de facto a sus contrapartes humanas en la versión HZ VL6 básica; †, corresponde a aminoácidos humanizados durante la implementación HZ VL6 a HZ VL4; §, corresponde a aminoácidos humanizados que permanecen murinos en la secuencia 224G11-HZ VL4;

Figura 73: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 22G11 humanizados y quiméricos. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico de anticuerpos 224G11 derivados de dominios humanizados dobles se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 74: ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de las formas diferentes del anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, anticuerpos recombinantes derivados 224G11 quiméricos y totalmente humanizados se probaron y compararan por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se miden a 450 nm;

Figura 75: ensayo de enlace basado en ELISA a Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humanos se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados 22G11 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet

recombinante revestido con plástico de mutantes sencillos de anticuerpos 224G11 totalmente humanizados derivados de VL4, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal;

Figura 76: ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet de anticuerpos 224G11 recombinantes. Actividad de enlace anti-Fc-cMet se mide en un ensayo basado en ELISA en donde conjugados Fc anti-humano se utilizan para detectar anticuerpos recombinantes derivados de 22G11 quiméricos y humanizados. Actividades de enlace dependientes de dosis en Fc-cMet recombinante revestido con plástico y mutantes sencillos y múltiples de los anticuerpos 224G11 humanizados totalmente derivados de VL4, se miden a 450 nm y después comparan con aquellos del anticuerpo quimérico de referencia/paternal; y

Figura 77: Ensayo de competencia HGF-cMet de anticuerpos recombinantes y murinos 224G11. En este ensayo basado en ELISA, enlace residual Fc-cMet recombinante con HGF revestido con plástico en la presencia de las diferentes formas de anticuerpo 224G11, se detecta con un anticuerpo anti-cMet no relacionado biotinilado. Anticuerpo monoclonal 224G11 murino purificado, mutantes quiméricas y sencillas o múltiples de los anticuerpos recombinantes 224G11 totalmente humanizados derivados de VL4, se probaron y compararon por sus habilidades para competir con enlace de HGF-cMet cuando se mide a 450nm.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos contra c-Met

Para generar anticuerpos anti-c-Met, ratones BALB/c de 8 semanas de edad se inmunizaron ya sea 3 a 5 veces en forma subcutánea con una línea celular transfectada CHO que expresa c-Met en su membrana de plasma (20×10^6 células/dosis/ratón) o 2 a 3 veces con una proteína de fusión de dominio extracelular c-Met (10-15 μg /dosis/ratón) (R&D Systems, Catálogo # 358MT) o fragmentos de esta proteína recombinante en mezcla con adyuvante completo de Freund, para la primer inmunización y adyuvante Freund incompleto para las siguientes. Protocolos mixtos en donde los ratones recibieron tanto células CHO-cMet como proteínas recombinantes también se realizaron. Tres días antes de la fusión celular, los ratones se reforzaron i.p. o i.v. con la proteína recombinante o fragmentos. Los bazos de los ratones se recolectaron y fusionaron a células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC) y sometieron a selección HAT. Cuatro fusiones se realizaron. En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, en especial de origen murino, es posible referirse a

técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" (Harlow and 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).

Hibridomas obtenidos inicialmente se cribaron por ELISA en la proteína recombinante c-Met y después por análisis FACS en líneas celulares A549 NSCLC, pancreáticas BxPC3 y U87-MG de glioblastoma (perfiles representativos se presentan en la Figura 1) para asegurarse que los anticuerpos producidos eran capaces de reconocer también el receptor nativo en las células de tumor. Reactores positivos en estas 2 pruebas se amplificaron, clonaron y un conjunto de hibridomas se recuperó, purificó y cribó por su habilidad para inhibir proliferación de células *in vitro* en el modelo BxPC3.

Para ese propósito, 50 000 células de BxPC3 se revistieron en placas de 96 pozos en medio RPMI, L. Glutamina 2 mM, sin SVF. 24 horas después de revestir, los anticuerpos a probar se agregaron a una concentración final en el intervalo de 0.0097 a 40 µg/ml 60 min antes de adición de 100 ng/ml de hHGF. Después de 3 días, las células se pulsaron con 0.5 µCi de [³H]timidina por 16 horas. La magnitud de [³H]timidina incorporada en ADN insoluble en ácido tricloroacético se cuantificó por conteo de centelleo en medio líquido. Los resultados se expresan como datos en crudo para realmente evaluar el efecto agonístico intrínseco de cada Mab (Figuras 2A y 2B).

Después, anticuerpos que inhiben al menos 50% de proliferación celular se evaluaron como sobrenadantes por análisis BRET en células transfectadas c-Met. Para este propósito, líneas celulares estables CHO que expresan C-Met-Rluc o C-Met-Rluc y C-Met-K1100A-YFP se generaron. Las células se distribuyeron en microplacas de 96 pozos blancas en DMEM-F 12/FBS 5% de medio de cultivo, uno o dos días antes de experimentos BRET. Las células primero se cultivaron a 37 grados C con CO₂ al 5%, a fin de permitir conexión celular a la placa. Las células después se ayunaron con 200 µl de DMEM/pozo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento, DMEM se retiró y las células rápidamente se lavaron con PBS. Las células se incubaron en PBS en la presencia o ausencia de anticuerpos para probarse o compuestos de referencia, 10 minutos a 37 grados C antes de la adición de coelenterazina, con o sin HGF, en un volumen final de 50 µl. Después de incubación por 10 minutos más a 37 grados C, la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm se inició, utilizando el luminómetro Mithras (Berthold) (1s/longitud de onda/pozo repetido 15 veces).

La proporción BRET se ha definido previamente [Angers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:3684-3689] como: $[(\text{emisión a } 530 \text{ nm}) - (\text{emisión a } 485 \text{ nm}) \times C_f] / (\text{emisión a } 485 \text{ nm})$, en donde C_f corresponde a $(\text{emisión a } 530 \text{ nm}) / (\text{emisión a } 485 \text{ nm})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc sola en las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación muestra que la proporción BRET corresponde a la proporción 530/485 nm que se obtiene cuando los dos socios estuvieron presentes, corregido por una proporción 530/485 nm que se obtiene bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solo el socio fusionado a R. reniformis luciferasa se presenta en el ensayo. Por razones de legibilidad, los resultados se expresan en unidades milliBRET (mBU); mBU corresponde a la proporción BRET multiplicada por 1000.

Después de esta segunda prueba *in vitro*, se seleccionaron 4 anticuerpos i) sin actividad intrínseca como una molécula entera en la prueba funcional de proliferación, ii) que inhiben significativamente la proliferación BxPC3 (Figuras 2A y 2B) y iii) que inhiben la dimerización de c-Met (Figura 3). Estos 3 anticuerpos del isotipo IgG1 kappa se describieron como 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1. En los experimentos, el 5D5 Mab, generado por Genentech, y disponible en ATCC, se agregó como un control para la actividad antagonística intrínseca.

Las Figuras 2A y 2B demuestran que 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 estuvieron sin ninguna actividad agonista en contraste con 5D5 que induce un estímulo dependiente de dosis de proliferación celular en ausencia de ligando. Una inhibición significativa de proliferación celular se observó con los 4 anticuerpos selectos. 5D5 está sin efecto en proliferación celular inducida por HGF en esta prueba.

Cuando se evalúa para bloqueo de dimerización, se observaron significantes efectos que llegan a 32, 55, 69 y 52% de inhibición de dimerización para 224G11, 223C4, 11E1 y 227H1, respectivamente. Comparado con señales basales en los experimentos respectivos, el anticuerpo 5D5 está sin efecto en este modelo de dimerización.

Ejemplo 2: Reconocimiento de proteína por anticuerpos anti-c-Met

Para caracterizar el patrón de reconocimiento de 3 anticuerpos selectos, se han configurado 3 ELISA con la proteína c-Met recombinante, su fragmento monomérico (que se obtiene por rompimiento de la proteína c-Met-Fc recombinante y el dominio SEMA recombinante).

Resultados presentados en la Figura 4, demuestran que los 4

anticuerpos reconocen tanto proteínas diméricas como monoméricas. Para realizar este ELISA, la proteína c-Met dimérica humana (R&D systems, cat# 358MT) se reviste a concentración de 0.7 µg/ml en PBS durante la noche a 4 grados C. Después de saturación de las placas (Costar #3690) con una solución de gelatina al 0.5%, 2 horas a 37 grados C, se incuban sobrenadantes de hibridoma por 1 hora a 37 grados C. Una vez enjuagado con PBS, el anticuerpo HRP anti-ratón (Jackson ImmunoResearch, # de catálogo 115-035-164) se agrega a cada pozo a una dilución de 1/5000 en amortiguador ELISA (gelatina al 0.1% / Tween 20 al 0.05% en PBS) y las placas se incubaron por 1 hora a 37 grados C. Después de 3 lavados en PBS, la actividad de la peroxidasa se revela por la adición de 50 µl de substrato TMB (Uptima). La reacción se deja que ocurra por 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene por la adición de 50 µl/pozo de una solución H₂SO₄ 1 M y lee en un lector de placas a 450 nm. El mismo tipo de protocolo se realizó en el dominio SEMA y c-Met monomérico pero en esos casos, las proteínas se revistieron a 5 y 3 µg/ml respectivamente.

El 5D5 Mab introducido como un control positivo reconoce como se espera la proteína SEMA. 224G11, 227H1 y 223C4 no ligan al dominio SEMA. 11E1 es capaz de ligar a SEMA.

Para determinar si 11E1 y 5D5, ambos que reconocen el dominio SEMA compiten para epítopes super-puestos, se realizó análisis BIAcore. El sistema BIAcore basado en el fenómeno de resonancia Plasmon de Superficie suministra datos al supervisar eventos de enlace en tiempo real. Es entonces útil para agrupar anticuerpos en los así denominados experimentos de "cartografía de epítipo". Un par de anticuerpos incapaces de ligar al mismo tiempo en la molécula de antígeno, se clasifican en el mismo grupo (sitios de enlace idénticos o vecinos). En el opuesto, cuando sus sitios de enlace respectivos están suficientemente distantes para permitir un enlace simultáneo de ambos anticuerpos, estos últimos se clasifican en dos grupos diferentes. En estos experimentos, el antígeno se emplea comúnmente como el ligando (inmovilizado en el chip-sensor) y los anticuerpos se utilizan sin etiquetado alguno como analitos (fase de solución).

Todos los experimentos descritos se han realizado en un instrumento BIAcore X (GE Healthcare Europe GmbH). Un chip-sensor CM5 (BIAcore) activado por un anti-Tag-6His Mab de ratón (R&D System ref. MAB050) se ha preparado siguiendo las instrucciones del fabricante al utilizar el equipo de acoplamiento amina (BIAcore). El amortiguador de corrida (HBS-EP) y el

amortiguador de regeneración (Glicina, HCl) son de BIAcore. Una versión soluble recombinante del receptor HGF humano producida como una molécula quimérica c-Met-Fc-Tag His fue de R&D systems (ref. 358-MT-CF). Los experimentos se realizaron a 25 grados C, a un gasto de flujo de 30 µl/min. Una solución de 10 µg/ml de c-Met en amortiguador de corrida se inyecta durante un minuto en la célula de flujo 2 (fc2) típicamente 270 RU de la forma soluble de c-Met se capturaron. La célula de flujo (fc1) se emplea como una referencia para verificar cualquier enlace no específico de los anticuerpos a la matriz de chip-sensor.

Inyecciones secuenciales de anticuerpos a probarse se realizaron. Un anticuerpo se inyectó en ambas células de flujo durante 2 minutos. Un segundo anticuerpo (o el mismo) se inyectó después en las mismas condiciones. Si no se observa enlace significativo, se realiza una tercera inyección con otro anticuerpo. El chip-sensor después se regenera por una sola inyección de 30 s del amortiguador de regeneración. Ya sea anticuerpos y c-Met-Fc se descargaron en esta etapa.

Análisis de los resultados:

La capacidad de un anticuerpo "A" para bloquear el enlace de un anticuerpo "B" se calcula por la proporción $BIA/C=(R2A/B/R1B) \times 100$: en donde R2A/B es la respuesta correspondiente al enlace de MAb "B" cuando se inyecta después de Mab "A" y R1B es la respuesta correspondiente al enlace de MAb "B" cuando se inyecta primero. Un BIA/C inferior a 20% significa que A es capaz de bloquear el enlace de B, de manera tal que A y B tienen sitios de enlace vecinos.

La cartografía de epítipo se ha realizado con 2 Mabs, 11E1 y 5D5.

Tabla 3

2° Ab (B)		
1° Ab (A)	11E1	5d5
11E1	6.5%	84.2%
5D5	98.4%	11.0%

La visualización del enlace alrededor de 270RU de c-Met-Fc capturado por las inyecciones secuenciales de 2 minutos de Mabs 5D5 (primero), 5D5 (segundo) y 11E1 (tercero) a una concentración de 10 µg/ml, cada una demostró que 5D5 y 11E1 ligan claramente a dos sitios distantes (Figura 5A). Esta observación se confirma por la secuencia recíproca del anticuerpo (Figura 5B).

La Tabla 3 resume la proporción de cálculo obtenida con las diferentes secuencias de estos 2 anticuerpos. Valores negros (más de 75%) significan que Mab A no bloquea el enlace de Mab B. Valores con negritas/itálicas (inferiores a 20%) significan que los sitios de enlace de ambos anticuerpos (A y B) son idénticos o suficientemente cercanos para inhabilitar un enlace simultáneo.

Ejemplo 3: Efecto de Mabs en fosforilación c-Met

Para determinar la actividad de anticuerpos anti-c-Met en fosforilación c-Met, un ensayo ELISA fosfo c-Met se configuró. Brevemente 500 000 células A549 se sembraron en cada pozo de placas de 6-pozos en medio F12K + FCS 10%. 16 horas antes de adición de HGF (100 ng/ml), las células se ayunaron y cada anticuerpo a probar se agregó a una concentración final de 30 µg/ml, 15 minutos antes de estímulo de ligando. 15 Minutos después de adición de HGF, amortiguador de lisis en frío se agrega, las células se rasparon y los lisados celulares se recolectaron y centrifugaron a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 grados C. Sobrenadantes se cuantificaron con un equipo BCA (Pierce) y almacenaron a -20 grados C. Para ensayo ELISA, un anticuerpo cabra anti-c-Met (R&D ref. AF276) se utiliza como un anticuerpo de captura (revestimiento durante la noche a 4 grados C) y después de una etapa de saturación (1 h a RT) con un amortiguador TBS-BSA al 5%, 25 µg de proteína de los diferentes lisados celulares, se agregan a cada pozo de la placa de 96 pozos. Después de un tiempo de incubación de 90 minutos a RT, las placas se lavaron cuatro veces y se agrega un anticuerpo anti-fosfo-c-Met (conejo anti-pY1230-1234-1235 c-Met). Después de 1 hora adicional de tiempo de incubación y 4 lavados, se agrega un anti-conejo-HRP (anti-rabbit-HRP) (Biosource) por 1 hora a RT y el substrato de Luminol se agrega antes de evaluación de la luminiscencia con un dispositivo Mithras. Resultados presentados en la Figura 6B demuestran que 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 inhiben fosforilación c-Met por 68, 54, 80 y 65% respectivamente en comparación con 5D5 Mab que exhibe una inhibición más débil de fosforilación c-Met (42%). En esta prueba, un efecto basal débil (menor a 20%) se observa con los 4 anticuerpos candidato (Figura 6A). Como se describe en los diversos ejemplos presentados en esta patente, este efecto basal débil no tuvo consecuencias en la actividad de anticuerpos en otras pruebas *in vitro* e *in vivo*. El 5D5 empleado como control exhibió, en esta prueba un efecto basal significativo.

Ejemplo 4: Desplazamiento de HGF radio-etiquetado por anticuerpos anti-c-Met

Para determinar si los anticuerpos anti-c-Met fueron capaces de

desplazar HGF, se organizaron experimentos de enlace. Brevemente, microplacas de 96 pozos FlashPlate de proteína A (Perkin Elmer), se saturaron con gelatina al 0.5% en PBS (200 μ l/pozo, 2 h a temperatura ambiente) antes de agregar c-Met-Fc recombinante (R&D Systems) como una proteína de revestimiento. Dos mil μ l de una solución de 1 μ g/ml de c-Met-Fc en PBS, se agregaron a cada pozo. Las placas después se incubaron durante la noche a 4 grados C. Sitios de proteína A residuales libres, se saturaron adicionalmente con hlgG no relevante (0.5 μ g/pozo en PBS) por 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS después de cada etapa.

Para ensayos de competencia, enlace de [^{125} I]-HGF (actividad específica $\sim$ 2,000 Ci/mmol) a 200 pM a c-Met inmovilizado, se midió en la presencia de concentraciones variantes de los anticuerpos monoclonales anti-c-Met 11E1, 224G11, 223C4, 227H1 o HGF (R&D Systems) en el intervalo de 0.1 pM a 1 μ M en PBS pH 7.4. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 6 h, después contaron en un contador de Centelleo de Microplacas - Packard Top Count Microplate Scintillation Counter. Enlace no específico se determina en la presencia de 1 μ M de HGF. El anticuerpo monoclonal 9G4, que no se dirige a c-Met pero reconoce específicamente una proteína de *E. coli*, se utiliza como control de isotipo IgG1 ratón.

Por ciento de total de enlace [^{125} I]-HGF específico se trozó como una función de concentración de ligando en gráficas semilog. Concentraciones de los diversos inhibidores requeridas para inhibir el enlace radioligando en 50% (IC_{50}), se determinaron gráficamente a partir de las curvas de competencia sigmoide obtenidas (Figuras 7A y 7B).

Como se esperó, HGF no radioetiquetado fue capaz de desplazar completamente el enlace [^{125} I]-HGF a c-Met inmovilizado, mientras que el anticuerpo de control 9G4 no muestra ninguna actividad de bloqueo HGF (Figuras 7A y 7B). Anticuerpos anti-c-Met monoclonales 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 fueron capaces de inhibir enlace [^{125} I]-HGF a c-Met inmovilizado, con valores IC_{50} de 20 nM, 3 nM, 2.7 nM y 5.8 nM, respectivamente. Los valores IC_{50} determinados para los anticuerpos 224G11, 223C4 y 227H1 fueron comparables con el valor IC_{50} determinado para HGF no radioetiquetado, que está comprendido entre 3 y 5 nM, mientras que el anticuerpo 11E1 exhibió un valor IC_{50} superior.

Ejemplo 5: Inhibición de invasión por anticuerpos anti-c-Met

Para evaluar el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-c-Met en el proceso de invasión, células A549 se revistieron en la cámara superior de

cámaras de invasión BD BioCoat™ Matrigel™ (pozos con diámetro de 6.5 mm con membranas de polycarbonato con pre-tamaño de 8- μ m). Células A459 se ayunaron 24 horas antes de realizar el ensayo de invasión. Después, 500 000 células a A549 se revistieron en amortiguador de quimiotaxia (medio DMEM, BSA 0.1%, Hepes 12 mM) en el pozo superior de cada cámara, sobre el revestimiento de Matrigel, ya sea con o sin el anticuerpo a probar (concentración Mab final 10 μ g/ml). Después de 1 hora de incubación de las placas a 37 grados C con CO₂ al 5%, las cámaras inferiores se llenaron, ya sea con medio de crecimiento que contiene 400 ng/ml de rhHGF o con medio de crecimiento solo. Las cámaras se incubaron por 48 horas adicionales a 37 grados C con CO₂ al 5%. Al final de este tiempo de incubación, células que permanecen en la superficie superior del filtro se retiraron suavemente con una torunda de algodón, células que migraron a la superficie inferior del filtro se lisaron, tiñeron con amortiguador de tinción CyQuant GR (Invitrogen) y contaron utilizando un lector de fluorescencia Berthold Mithras LB940. Todas las condiciones se probaron como triplicados.

Como se esperó HGF induce una invasión significativa de células de tumor, comparables con la observada con FCS al 10% introducido como un control positivo (Figura 8). El IgG1 9G4 murino introducido como un control de isotipo no tiene efecto significativo en invasión inducida HGF o basal, cuando se compara con células revestidas sin IgG. No se notó efecto agonista con 11E1, 224G11, 223C4 y 227H1 cuando se agregan solos y una inhibición significativa y comparable de la invasión inducida por HGF se observa con los 3 Mabs.

Ejemplo 6: Inhibición de sanado de heridas por anticuerpos anti-c-Met

HGF estimula la movilidad. Para determinar si los anticuerpos anti-HGF fueron capaces de inhibir migración, células NCI-H441 se desarrollaron a alta densidad y se introdujo un espacio con una punta de pipeta P200. Las células después se estimularon para migrar a través del espacio con HGF (100 ng/ml), en presencia o ausencia de 11E1. Pozos con 11E1 solos, fueron también evaluados. Cada condición de prueba se evaluó como un sextuplicado y 3 experimentos independientes se realizaron. Después de una incubación durante la noche, las células se visualizaron con una Axio Vision Camera (objetivo x4).

HGF induce una migración significativa resultando en un cierre completo del espacio dentro de una noche (Figura 9). IgG1 irrelevante 9G4 empleado como un control de isotipo no tiene efecto alguno en migración celular. Como se esperó, se observó un efecto agonista con 5D5 cuando se agrega solo

pero una inhibición significativa de migración celular se observa con este anticuerpo en presencia de HGF en la porción del espacio que permanece abierto. El fragmento Fab de 5D5 está sin efecto agonista cuando se agrega solo. Sin embargo, no se observa actividad de este fragmento en la presencia de HGF. Como se observa con el control de isotipo 9G4, MAb 11E1 no tuvo efecto agonista cuando se agrega solo y se comporta como un antagonista completo en la presencia de HGF.

Ejemplo 7: Ensayo de Dispersión

Células SK-HEP-1 se sembraron a baja densidad (1.10^4 células/pozo) en una placa de 24-pozos en DMEM con FCS al 10% y desarrollan por 24 horas antes de adición, al mismo tiempo, de HGF (100 ng/ml) y los anticuerpos a probar (10 µg/ml). Después de 72 horas de incubación, se fijaron y tiñeron colonias con violeta cristal al 0.2% en metanol y estimaron por dispersión visualmente. Cada condición probada se probó en triplicado y se realizaron 3 experimentos independientes.

La adición de HGF a células SK-HEP-1 induce una dispersión significativa de células (Figuras 10A y 10B). El anticuerpo 9G4 introducido como un control de isotipo no tiene efecto ni solo o en la presencia de HGF. Como se espera, el anticuerpo 5D5 exhibe un efecto agonista significativo solo y no se observa efecto inhibitorio cuando se agrega 5D5 con HGF (Figura 10A). No se observa efecto agonista ni con 11E1 (Figura 10A) ni con 224G11 (Figura 10B) agregados solos. Un efecto inhibitorio muy significativo de estos anticuerpos se demuestra en la presencia de HGF (Figuras 10A y 10B).

Ejemplo 8: Ensayo de Tubulogénesis Tri-dimensional

Células SK-HEP-1 se sembraron a 1.10^4 células/pozo en una placa de 24 pozos en DMEM con FCS al 10%/Matrigel (50/50) e incubaron por 30 minutos antes de adición, al mismo tiempo, de HGF (100 ng/ml) y los anticuerpos a probar (10 µg/ml). Después de 7 días de incubación, las células se estimaron visualmente por formación de tubos. Cada condición probada se realizó como un triplicado y se efectuaron 3 experimentos independientes.

La adición de HGF induce una formación de tubo SK-HEP-1 significativa (Figura 11). El anticuerpo 9G4 introducido como un control de isotipo no tuvo efecto ni solo ni en la presencia de HGF. Como se espera, el anticuerpo 5D5 exhibe un efecto agonista significativo solo y no se observa efecto inhibitorio cuando 5D5 se agrega con HGF. No se observa efecto agonista con 11E1, 223C4 y 224G11 agregados solos y un efecto inhibitorio completo se demuestra tanto con

11E1 como 223C4, en la presencia de HGF. Una inhibición parcial pero significativa se observa con 224G11Mab.

Ejemplo 9: Formación de Esferoide

Para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-c-Met para inhibir el crecimiento de tumor *in vitro*, en un modelo cercano a una situación *in vivo*, se generaron esferoides de células de glioblastoma humano U-87MG (ATCC # HTB-14). Las células desarrolladas como una monocapa se desprendieron con tripsina-EDTA y resuspenden en medio de cultivo celular completo (DMEM) suplementado con FBS al 10%. Se iniciaron esferoides al inocular 625 células en pozos sencillos de fondo redondo, 96 placas en DMEM-FCS al 10%. Para impedir adhesión celular a un sustrato, las placas se pre-revistieron con polyHEMA en etanol al 95% y secaron al aire a temperatura ambiente. Las placas se incubaron bajo condiciones de cultivo celular estándar a 37 grados C, CO₂ al 5% en incubadoras humidificadas. Anticuerpos monoclonales purificados (10 µg/ml) se agregaron después de 3 y 7 días de cultivo de esferoide. HGF (400 ng/ml) se agrega una vez después de 4 días de cultivo. Los esferoides se mantienen en cultivo por al menos 10 días. Después, se supervisa crecimiento de esferoides al medir el área de esferoides utilizando un módulo de auto-medición del soporte lógico o programa axiovision. El área se expresa en µm². 8-16 esferoides se evaluaron por cada condición.

Las Figuras 12A y 12B mostraron que en la presencia de FCS al 10%, no se observó estímulo cuando HGF se agrega al medio completo. Como se espera, el control de isotipo 9G4 no tiene efecto en crecimiento de esferoides. 11E1 y 223C4 reducen significativamente el crecimiento de esferoides tanto en la presencia como en la ausencia de HGF. No se observó efecto con el fragmento 5D5 Fab.

Ejemplo 10: Actividad *in vivo* de Mabs anti-c-Met en el modelo de xenoinjerto U87MG

Ratones atímicos de seis a ocho semanas de edad se alojaron en jaulas con tapa de filtro esterilizado, que se mantienen en condiciones estériles y manipulan de acuerdo con las guías francesas y europeas. U87-MG, una línea celular de glioblastoma, expresa c-Met y autocrina para el ligando HGF se selecciona para evaluaciones *in vivo*. Se inyectaron ratones subcutáneamente con 5x10⁶ células. Después, seis días después de implante celular, los tumores fueron medibles (aproximadamente 100 mm³), los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con un tamaño de tumor comparable y trataron dos veces a la

semana con 1 mg/dosis de cada anticuerpo a probar. Los ratones fueron seguidos para la observación de velocidad de crecimiento de xenoinjerto y cambios en peso corporal. Volumen de tumor se calcula por la fórmula: $\pi (Pi)/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 13 y demuestran que todos los anticuerpos probados inhiben significativamente el crecimiento *in vivo* de células U87-MG. El uso de un anticuerpo anti-IGF-1R neutralizante (IgG1) en el panel A, demuestra que la inhibición *in vivo* observada, se relaciona específicamente con una modulación del eje HGF-cMet.

Ejemplo 11: Actividad *in vivo* de Mabs anti-c-Met en el modelo de xenoinjerto NCI-H441

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

Para determinar si esta línea celular expresa altos niveles de c-Met y es capaz de producir HGF, se realizaron tanto RT-PCRs cuantitativos como FACS o ELISA (Quantikine HGF; R&D systems). Para RT-PCRs cuantitativos, HGF total o niveles de expresión de transcripción cMet en líneas celulares se estimaron por PCR cuantitativo utilizando la técnica TaqMan^{MR} estándar. Nivel de transcripción c-Met o HGF se normalizaron a la proteína Ribosomal de gen doméstico o constitutivo, grande, P0 (RPL0) y los resultados se expresan como valores de expresión normalizados (método 2-ddCT).

Los conjuntos o juegos de cebador/sonda para RPL0 fueron delantero, 5'-gaaactctgcattctcgcttctg-3' (SEQ ID No. 47); inverso, 5'-aggactcgttgtacccgttga-3' (SEQ ID No. 48); y sonda, 5'-(FAM)-tgacattggctacccaactgttgca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 49). Los juegos cebador/sonda para HGF fueron delantero, 5'-aacaatgcctctggttcc-3' (SEQ ID No. 50); inverso, 5'-ctttagctgcgtcctttac-3' (SEQ ID No. 51); y sonda, 5'-(FAM)-ccttcaatagcatgtcaagtggagtga-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 52). Los juegos cebador/sonda para cMet fueron delantero, 5'-cattaaaggagacctcacatagcta-3' (SEQ ID No. 53); inverso, 5'-cctgatcgagaaaccacaacct-3' (SEQ ID No. 54); y sonda, 5'-(FAM)-catgaagcgaccctctgatgtccca-(TAMRA)-3' (SEQ ID No. 55). El protocolo de termociclado consistió de fundir a 50 grados C por 2 minutos y 95 grados C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 grados C por 15 segundos y 62 grados C por 1 minuto.

No se encontró ARNm para HGF en NCI-H441 (Figura 14) y HGF no es detectable por ELISA en sobrenadantes de NCI-H441. En estos experimentos

U87-MG, una línea celular de glioblastoma conocida como una línea celular autocrina para HGF, se introduce como un control positivo. El análisis RT-PCR mostró un nivel significativo de ARNm de HGF en U87-MG y 1.9 ng de HGF/millón de células se detectan en el sobrenadante de células U87-MG. Tanto análisis cuantitativo RT-PCRs como FACS Figuras 15A y 15B, demostró que como se esperaba células NCI-H441 sobre expresan significativamente c-Met y que esta expresión fue dramáticamente superior a la observada para células U87-MG. En este experimento, la línea celular MCF-7 se introduce como un control negativo. Tomado en conjunto NCI-H441 aparece como una línea celular no autocrina activada en forma constitutiva, capaz de desarrollar independientemente de ligando HGF en donde una dimerización independiente de ligando de c-Met ocurre como una consecuencia de la sobre-expresión del receptor.

La evaluación de anticuerpos anti-c-Met en la actividad *in vivo* de esta línea celular no autocrina puede dar lugar a ciertas percepciones respecto a su potencia para impactar en dimerización de c-Met.

La Figura 16 demuestra que 224G11, 11E1 y 227H1 inhiben significativamente el crecimiento *in vivo* de NCI-H441, sugiriendo que además de inhibición dependiente de ligando, estos anticuerpos capaces de inhibir dimerización, son también capaces de hacer blanco a una inhibición independiente de ligando de c-Met. Como se mencionó anteriormente, en la especificación, con esa última propiedad 224G11, 11E1 y 227H1 se muestran diferentes del anticuerpo anti-c-Met 5D5 de un brazo (OA-5D5).

Ejemplo 12: Proceso de humanización por injerto-CDR del anticuerpo 224G11

I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia de nucleótidos de 224G11VL con genes de células germinales murinos

Como una etapa preliminar, la secuencia de nucleotídica de 224G11 VL se comparó con las secuencias de genes de células germinales bovinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGKV3-5*01 y IGKJ4*01 murinos con una identidad de secuencia de 99.31% para la región V y 94.28% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 224G11VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 17A para el gen V

y 17B para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 224G11VL con los genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de células germinales humanas que exhibe la mejor identidad con 224G11VL. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica de 224G11VL se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, alineamientos entre las secuencias proteicas se realizaron para buscar mejores homologías.

Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de dos secuencias V humanas receptoras posibles para las 224G11 VL CDRs murinas. Alineamiento nucleotídico da a los genes de células germinales IGKV3-11*01 humanas con una identidad de secuencia de 75.99% mientras que el alineamiento proteico da a los genes de células germinales IGKV4-1*01 humanas con una identidad de secuencia de 67.30%. Vale la pena notar que en ambos casos, los dos genes de células germinales más cercanos y las secuencias analizadas muestran diferentes longitudes de aminoácidos CDR1 (10 aminoácidos en 224G11 VL; 6 aminoácidos en IGKV3-11*01; 12 aminoácidos en IGKV4-1*01).

Para la región J, la mejor calificación de homología se obtuvo primero con IGKJ3*01 humano que muestra una identidad de secuencia de 80%. Pero un número superior de nucleótidos idénticos consecutivos y mejor ajuste de aminoácidos se ha encontrado en el alineamiento con el gen de células germinales IGKJ4*02 humanas (identidad de secuencia de 77.14%). De esta manera, se elige el gen de células germinales IGKJ4*02 que recibe la región J humana para los 11E1 VL CDRs murinos.

Los alineamientos se representan en las Figuras 18A para la región V y 18B para la región J.

Versión humanizada de 224G11 VL

Dada la posibilidad de dos regiones V humanas receptoras para las 224G11 VL CDRs murinas, dos versiones humanizadas del dominio 224G11 se describirán. La primera corresponde a una prueba inicial para un marco humano con una longitud CDR1 más corta (IGKV3-11*01), la segunda con una longitud de CDR1 más larga (IGKV4-1*01).

*a) Versión humanizada basada en IGKV3-11*01 de 224G11 VL*

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV3-11*01 y

IGKJ4*02 y también las CDRs de 224G11 VL murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 19A, los residuos con negritas en la secuencia 224G11 VL corresponden a los veinticinco aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio de 224G11 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV3-11*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en la estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, tres de los veinticinco residuos diferentes se han identificado para mutar eventualmente. Estos tres residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son M39 murino en L humano, H40 en A y R84 en G. Estos residuos con rango uno se muestran en la Figura 19a, como residuos con negritas en la secuencia 224G11 HZIVL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, otras mutaciones pueden ser identificadas. Pueden mencionarse los siguientes residuos con rango dos, es decir los residuos 15 (L/P), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) y 99 (V/F) en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente, no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, todos los otros dieciséis residuos rango tres entre los veinticinco diferentes aminoácidos, pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 19A representa el 224G11 VL humanizado con base en IGKV3-11*01 implementado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

b) Versión humanizada basada en IGKV4-1*01 de 224G11 VL

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV4-1*01 y IGKJ4*02 y también las CDRs de la 224G11 VL murina a los marcos de estas

secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 19B, los residuos con negritas en la secuencia 224G11 VL corresponden a veintidós aminoácidos que encontraron diferentes entre el dominio de 224G11 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV4-1*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, el enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, la localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los veintidós residuos diferentes se han identificado eventualmente mutados. Estos cuatro residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son el L4 murino en M humano, M39 en L, H40 en A y R84 en G. Estos residuos de rango uno se muestran en la Figura 19B como residuos con negritas en la secuencia 224G11 HZ2VL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse, no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir residuos 25 (A/S), 66 (N/T), 67 (L/R), y 93 (P/S) en donde mutaciones también pueden ser concebidas en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente no se limitan pero deben considerarse como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, todos los otros catorce residuos rango tres entre los veintidós diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 19B representa la 224G11 VL humanizada con base en IGKV4-1*01, con las mutaciones anteriormente mencionadas previamente identificadas con mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

Comparación de la secuencia nucleotídica de 224G11 VH con genes de células germinales murinos

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 224G11 VH se compara con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de

la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGHV1-18*01, IGHD2-4*01 y IGHJ2*01 murinos 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, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 224G11 VH para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 20A para el gen V, 20B para el gen D y 20C para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 224G11 VH con los genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 224G11 VH se ha buscado. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica 224G11 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, se hicieron alineamientos entre las secuencias proteicas para buscar mejores homologías.

Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de la misma secuencia IGHV1-2*02 V humana receptora para las 224G11 VH CDRs murinas con una identidad de secuencia de 75.00% al nivel nucleotídico y 64.30% a nivel protéico.

Vale la pena notar que la región D pertenece estrictamente a la región CDR3 en el dominio VH. El proceso de humanización se basa en un enfoque de "injerto CDR". Análisis de los genes D humanos más cercanos no es útil en esta estrategia.

Buscando homologías para la región J lleva a la identificación del gen de célula germinal IGHJ4*04 humano con una identidad de secuencia de 78.72 %.

El gen de célula germinal IGHV1-2*02 V humano y el gen de célula germinal IGHJ4*01 J humano, de esta manera se han seleccionado como las secuencias humanas receptoras para las 224G11 VH CDRs murinas.

Alineamientos se representan en las Figuras 21A para la región V y 21B para la región J.

Versión humanizada de 224G11 VH

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar o ligar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-2*02 y IGHJ4*01 y también las CDRs del 224G11 VH murino con los marcos de

estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 22, los residuos con negritas en la secuencia 224G11 VH corresponden a los treinta aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 224G11 VH y los fragmentos humanos selectos (RF humano, es decir IGHV1-2*02 y IGHJ4*01).

Respecto a los varios criterios tales como su conocida participación en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en la estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre residuos murinos y humanos, la localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los treinta diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cuatro residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son D51 murino en E humano, G55 en W, V80 en R y K82 en T. Estos residuos rango uno se muestran en la Figura 22, como residuos con negritas en la secuencia 224G11 HZVH en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no están limitados sino deben ser considerados como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 25 (T/A), 48 (E/Q), 49 (S/G), 53 (I/M), 76 (A/V), 78 (L/M) y 90 (D/E), en donde mutaciones también pueden ser concebidas en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados para probarse eventualmente, no están limitados pero deben considerarse como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, todos los otros diecinueve residuos rango tres entre los treinta diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 22 representa la 224G11 VH humanizada con las mutaciones anteriormente mencionadas, claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

Ejemplo 13: Proceso de humanización por injerto CDR del anticuerpo 227H1

I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia nucleotídica de 227H1 VL con los genes de células germinales murinas.

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 227H1 VL se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGKV3-5*01 y IGKJ4*01 murinas con una identidad de secuencia de 96.90% para la región V y 97.29% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido emplear directamente las secuencias 227H1 VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 23A para el gen V y 23B para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 227H1 VL con los genes de células germinales humanas.

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humano que exhibe la mejor identidad con 227H1 VL. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica de 227H1 VL se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, se realizaron alineamientos entre secuencias proteicas para buscar mejores homologías.

Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de dos secuencias V humanas receptoras posibles para las 227H1 VL CDRs murinas. Alineamientos nucleotídico da al gen de célula germinal IGKV3- 11*01 humana con una identidad de secuencia de 74.91%, mientras que el alineamiento proteico da al gen de célula germinal IGKV4-1*01 humana con una identidad de secuencia de 64.00%. Vale la pena notar que en ambos casos, estos dos genes de células germinales más cercanos y las secuencias analizadas muestran diferentes longitudes de aminoácidos CDR1 (10 aminoácidos en 227H1 VL; 6 aminoácidos en IGKV3-11*01; 12 aminoácidos en IGKV4-1*01).

Para la región J, la mejor calificación de homología se obtuvo primero con el IGKJ3*01 humano que muestran una identidad de secuencia de 78.38%. Pero un número superior de nucleótidos idénticos consecutivos y un mejor ajuste de aminoácidos se han encontrado en el alineamiento con el gen de células germinales IGKJ4*02 humano (identidad de secuencia de 75.68%). De esta manera, el gen de células germinales IGKJ4*02 se selecciona como la región J humana receptora para las 227H1 VL CDRs murinas.

Alineamientos se representan en las Figuras 24A para la región V y 24B para la región J.

Versión humanizada de 224G11 VL

Dada la posibilidad de dos regiones V humanas receptoras para las 227H1 VL CDRs murinas, se describirán dos versiones humanizadas del dominio 227H1 VL. La primera corresponde a una prueba inicial para un marco humano con una longitud CDR1 más corta (IGKV3-11*01), la segunda con una longitud CDR1 más larga (IGKV4-1*01).

a) Versión humanizada de 227H1 VL basada en IGKV3-11*01

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten de enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV3-11*01 e IGKJ4*02 y también las CDRs del 227H1 VL murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 25A, los residuos con negritas en la secuencia 227H1 VL corresponden a los veintiséis aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV3-11*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su conocida participación en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, tres de los veintiséis residuos diferentes se han identificado como eventualmente mutados. Estos tres residuos más importantes definidos y mutaciones en sus contra-partes humanas son 139 murino en L humano, H40 en A y R84 en G. Estos residuos de rango uno se muestran en la Figura 25A como residuos con negritas en la secuencia 227H1 HZ1VL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no están limitados sino que deben considerarse como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir residuos 15 (L/P), 25 (V/A), 49 (P/A), 67 (L/R), 68 (E/A), 93 (P/S) y 99 (S/F) en donde las mutaciones también pueden concebirse en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente, no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, pueden reconsiderarse todos los otros dieciséis residuos rango tres entre los veinticinco diferentes aminoácidos.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán en

forma individual o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 25A representa el 227H1 V1 humanizado basado en IGKV3-11*01 implementado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

b) Versión humanizada de 227H1 VL basada en IGKV4-1*01

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en ligar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV4-1*01 y IGKJ4*02 y también las CDRs del 227H1 VL murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 25B, los residuos con negritas en la secuencia 227H1 VL corresponden a los veinticuatro aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV4-1*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su conocida participación en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en la estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los veinticuatro diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cuatro residuos más importantes definidos y mutaciones en sus contra-partes humanas son L4 murino en M humano, 139 en L, H40 en A y R84 en G. Estos residuos rango uno se muestran en la Figura 25B como residuos con negritas en la secuencia 227H1 HZ2VL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 25 (V/S), 66 (N/T), 67 (L/R) y 93 (P/S) en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, todos los dieciséis otros residuos rango tres entre los veintidós aminoácidos diferentes pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán

individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 25B representa el 227H1 VL humanizado con base en IGKV4-1*01 implementado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

Comparación de la secuencia nucleotídica de 227H1 VH con los genes de células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 227H1 VH se compara con la secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.ciiies.fr>).

Genes de células germinales IGHV1-18*01, IGHD1-1*02 e IGHJ2*01 murinas con una identidad de secuencia de 92.70% para la región V, 63.63% para la región D y 91.48% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el usar directamente las secuencias 227H1 VH para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 26A para el gen V, 26B para el gen D y 26C para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 227H1 VH con los genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 224G11 VH. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica de 227H1 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. La secuencia IGHV1-2*02 V humana receptora para las 224G11 VH CDRs murinas con una identidad de secuencia de 72.92% de esta manera se identificó.

Vale la pena notar que la región D pertenece estrictamente a la región CDR3 en el dominio VH. El proceso de humanización se basa en un enfoque de "injerto CDR". El análisis de los genes D humanos más cercanos no es útil en esta estrategia.

Buscando homologías para la región J lleva a la identificación del gen de célula germinal IGHJ4*01 humana con una identidad de secuencia de 78.72%.

El gen de células germinales IGHV1-2*02 V humanas y el gen de células germinales IGHJ4*01 J humanas de esta manera se han seleccionado

como las secuencias humanas receptoras para las 227H1 VH CDRs murinas.

Los alineamientos se representan en las Figuras 27A para la región V y 27B para la región J.

Para optimización de la selección, la persona con destreza en la técnica también pueden ser alineamientos entre las secuencias proteicas a fin de ayudarles en la selección.

Versión humanizada de 227H1 VH

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-2*02 y IGHJ4*01 y también las CDRs del 227H1 VH murino con los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 28, los residuos con negritas en la secuencia 227H1 VH corresponden a los treinta y dos aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VH y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGHV1-2*02 y IGHJ4*01).

Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre los residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, seis de los treinta y dos residuos diferentes se han identificado mutados eventualmente. Estos seis residuos más importantes definidos y mutaciones en sus contra-partes humanas son L39 murino en M humano, N40 en H, L55 en W, T66 en N, V80 en R y K82 en T. Estos residuos rango uno, se muestran en la Figura 28 como residuos con negritas en la secuencia 227H1 HZVH en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no están limitados sino deben considerarse como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 48 (K/Q), 49 (T/G), 53 (I/M), 76 (A/V) y 78 (L/M) en donde las mutaciones también pueden conceptuarse en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente no están limitados sino que deben ser considerados como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, todos los veintiún otros residuos rango tres entre los treinta diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán

individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 28 representa el 227H1 VH humanizado con las mutaciones anteriormente mencionadas, claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

Ejemplo 14: Proceso de humanización por injerto CDR del anticuerpo 223C4

I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia nucleotídica de 223C4 VL con los genes de células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 223C4 VL, se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>) .

Los genes de células germinales IGKV12-46*01 y IGKJ2*01 murinas con una identidad de secuencia de 99.64% para la región V y 94.59% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 223C4 VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 29A para el gen V y 29B para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 223C4 VL con genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 223C4 VL. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica de 223C4 VL se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT.

Genes de células germinales IGKV1-NL1*01 y IGKJ2*01 humanas con identidad de secuencia de 78.49% para la región V y 81.08% para la región J, respectivamente se han identificado. Los genes de células germinales IGKV1-NL1*01 para la región V y IGKJ2*01 para la región J de esta manera se han seleccionado como secuencias humanas receptoras para las 223C4 VL CDRs murinas.

Los alineamientos se representan en las Figuras 30A para la región V y 30B para la región J.

Para optimización de la selección, la persona con destreza en la

técnica también pueden hacer alineamientos entre las secuencias proteicas a fin de ayudarle en la selección.

Versión humanizada de 223C4 VL

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGKV1-NL1*01 y IGKJ2*01 y también las CDRs de 223C4 VL murinos a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

En esta etapa de proceso, un modelo molecular de dominios Fv murinos 223C4 puede desarrollarse y es útil en la selección de los residuos murinos a conservarse debido a sus papeles en el mantenimiento de la estructura tri-dimensional de la molécula o en el sitio de enlace y función de antígeno. Más particularmente, 9 residuos a mutar, eventualmente se han identificado.

En una primera etapa, se probarán los residuos involucrados en las anclas CDR o estructura. Estos residuos son el residuo 66 (R/N) y el residuo 68 (E/V).

En una segunda etapa, residuos expuestos a solvente, y como tales que pueden involucrar inmunogenicidad, también se probarán. Estos son los residuos 49 (A/S), 51 (K/Q), 69 (S/D), 86 (D/Q) y 92 (S/N).

Después, en una tercera etapa, residuos involucrados en estructura/plegamiento de dominio variable también puede mutarse. Estos residuos son el residuo 46 (P/Q) y el residuo 96 (P/S).

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no están limitados pero deben considerarse como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, otras mutaciones pueden ser identificadas. Pueden mencionarse los siguientes residuos, es decir los residuos 9 (S/A), 13 (A/V), 17 (D/E), 18 (R/T), 54 (L/V), 88 (T/S), 90 (T/K), 100 (A/G) y 101 (T/S), en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra modalidad preferida.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 31 representa 223C4 VL humanizado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el que se realizará la mutación.

II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

Comparación de la secuencia nucleotídica de 223C4 VH con genes de células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 223C4 VH se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGHV1-18*01, IGHD6-3*01 y IGHJ4*01 murinas con una identidad de secuencia de 98.95% para la región V, 72.72% para la región D y 98.11% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 223C4 VH para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 32A para el gen V, 32B para el gen D y 32C para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 223C4 VH con los genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 223C4 VH se ha buscado. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica de 223C4 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT.

Los genes de células germinales IGHV1-2*02, IGHD1-26*01 y IGHJ6*01 humanas con una identidad de secuencia de 76.38% para la región V, 75.00% para la región D y 77.41% para la región J, respectivamente, se han identificado. Los genes de células germinales IGHV1-2*02 para la región V y IGHJ6*01 para la región J, de esta manera se han seleccionado que reciben las secuencias humanas para las 223C4 VH CDRs murinas.

Alineamientos se representan en las Figuras 33A para la región V, 33B para la región D y 33C para la región J.

Para optimización de la selección, la persona con destreza en la técnica también puede hacer alineamientos entre las secuencias proteicas a fin de ayudarse en la selección.

Versión humanizada de 223C4 VH

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-2*02 y IGHJ6*01 y también las CDRs de 223C4 VH murino a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

En esta etapa del proceso, un modelo molecular de los dominios Fv murinos 223C4 puede desarrollarse y es útil en la selección de los residuos murinos a conservarse debido a sus papeles en el mantenimiento de la estructura

tri-dimensional de la molécula o en la función y sitio de enlace de antígeno. Más particularmente, se han identificado 14 residuos a mutar eventualmente.

En una primera etapa, se probarán residuos involucrados en la estructura o anclas CDR. Estos residuos son los residuos 40 (H/D), 45 (A/S), 55 (W/D), 66 (N/I) y 67 (Y/F).

En una segunda etapa, residuos expuestos a solvente, y como tal que pueden involucrar inmunogenicidad, también se probarán. Estos son los residuos 1 (Q/E), 3 (Q/L), 5 (V/Q), 48 (Q/M) y 80 (R/V).

Después, en una tercera etapa, residuos involucrados en estructura/plegamiento de dominio variable también pueden mutarse. Estos son los residuos 9 (A/P), 13 (K/V), 22 (S/P) y 46 (P/H).

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probar, no son limitados sino deben ser considerados como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos, es decir los residuos 12 (V/L), 21 (V/I), 43 (R/K), 49 (G/S), 53 (M/I), 68 (A/N), 72 (Q/K), 75 (R/K), 76 (V/A), 78 (M/L), 82 (T/K), 84 (I/S), 92 (S/R), 93 (R/S), 95 (R/T) y 97 (D/E), en los cuales mutaciones también pueden concebirse en otra modalidad preferida.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 34 representa el 223C4 VH humanizado con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

Ejemplo 15: Actividad anti-tumor de 224G11 MAb murina sola o combinada con el agente quimioterapéutico Navelbine® en el modelo de tumor NCI-H441 de xeno-injerto establecido

Enfoques quimioterapéuticos exitosos dependen en parte de la respuesta celular a inductores apoptóticos y el balance entre las rutas pro- y anti-apoptósica dentro de la célula. El efecto protector de c-Met activado en supervivencia celular se ha documentado. Primordialmente resulta de una expresión incrementada de la proteína Bcl-2 y Bcl-x1 anti-apoptósica como consecuencia de señalización mediada por PI3-K que a su vez inhibe la apoptosis dependiente mitocondrial (caspasa 9). Sin duda, se concibe que el sistema HGF/c-Met con su efecto regulatorio marcado en proceso apoptótico también puede influenciar la quimiosensibilidad de células de cáncer. Esta hipótesis como se ha probado con Navelbine®, un agente quimioterapéutico comercializado

utilizado para tratamiento de cáncer pulmonar (Aapro *et al.*, Crit.Rev.Oncol.Hematol. 2001, 40:251-263; Curran *et al.*, Drugs Aging. 2002, 19:695-697). El modelo NCI-H441 NSCLC de xeno-injerto se utiliza ya que se ha descrito previamente que esta línea celular es sensible tanto a Navelbine (Kraus-Berthier *et al.*, Clin.Cancer Res., 2000; 6:297-304) como a terapia que hace blanco en c-Met (Zou H. T. *et al.*, Cancer Res. 2007, 67: 4408-4417).

Brevemente, células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10% y L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción o injerto prendido, de manera tal que estuviera en la fase de crecimiento exponencial. Diez millones de células NCI-H441 se injertaron en PBS a ratones desnudos Swiss de 7 semanas de edad. Tres días después del implante, se midieron tumores y los animales se dividieron en 4 grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. con una dosis de carga de 2 mg de 224G11/ratón y después dos veces por semana por 43 días, con 1 mg de anticuerpo/ratón. 9G4 MAb se utilizó como un control de isotipo.

Navelbine® se suministró por inyecciones i.p. a una dosis de 8 mg/kg los días 5, 12, 19 post-inyección de célula. Para terapia combinada tanto 224G11 como Navelbine®, los dos compuestos se administraron por separado. En esta experiencia, los 2 compuestos se utilizaron en sus dosis óptimas. Volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $p/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

La Figura 35 demuestra que 224G11 es tan eficiente como Navelbine® cuando se utiliza como una terapia de un agente solo. Un beneficio significativo de combinar ambas terapias se observa con regresiones completo de tumor observadas en 3 de 6 ratones al día 63.

Ejemplo 16: Inhibidores c-Met y angiogénesis

Además de su papel directo en la regulación de una variedad de funciones de células de tumor, la activación de c-Met también se ha implicado en angiogénesis de tumor. Células endoteliales expresan c-Met y HGF estimula el crecimiento celular endotelial, invasión y movilidad (Nakamura Y. *et al.*, Biochem. Biophys. Res., Commun. 1995, 215:483-488; Bussolino F. *et al.*, J. Cell Biol. 1992, 119:629-641). La regulación coordinada de crecimiento, invasión y movilidad en células endoteliales vasculares por HGF/c-Met, se ha demostrado que resulta en la formación de tubos endoteliales capilares 3D *in vitro* (Rosen E. M. *et al.*, Supplementum to Experientia 1991, 59:76-88).

Para determinar una interferencia potencial de Mabs anti-c-Met con angiogénesis inducida por HGF, dos juegos de experimentos se realizaron incluyendo i) la evaluación de MAbs en proliferación HUVEC y ii) la prueba de MAbs de formación de tubo HUVEC.

Para experimentos de proliferación, 7500 HUVEC se revistieron en cada pozo de una placa de 96 pozos previamente revestida con laminina. Células se desarrollaron 24 horas del medio de ensayo EMB-2 suplementado con FBS 0.5% y heparina. Después, MAbs a probar (0.15 a 40 µg/ml) se agregaron por 1 hora antes de adición de 20 ng/ml de HGF. Después de 24 horas adicionales, las células se pulsaron con 0.5 µCi de [³H] Timidina. La magnitud de [³H] Timidina incorporada se cuantificó por conteo de centelleo de líquido. En este experimento, 9G4 MAb es un anticuerpo irrelevante empleado como un control de isotipo IgG1.

Resultados expresados como datos crudos en la Figura 36 demuestran que, como se esperó HGF es un inductor potencial de crecimiento celular HUVEC. Anticuerpos evaluados en la ausencia HGF no exhiben ninguna actividad proliferativa agonista en HUVEC cualquiera que sea la dosis probada. En presencia de HGF, una inhibición dependiente de dosis dramática se observa para ambas 11E1 y 224G11 MAbs.

Para evaluación de formación de tubo HUVEC, 25000 células incubadas 30 minutos con anticuerpos a probar, se revistieron en placas de 48 pozos revestidas con matrigel. Después HGF 50 ng/ml se agrega y las placas se incubaron a 37 grados C. Medio después se recolecta y CMFDA 5 µM se agrega por 15 minutos antes de observar al microscopio.

Los resultados mostrados en la Figura 37 demuestran que como se espero HGF induce una formación de tubo significativa. El anticuerpo 9G4 introducido como un control de isotipo IgG1 no tuvo efecto alguno en formación de tubo inducida por HGF mientras que tanto 11E1 como 224G11 inhiben formación de tubo dramáticamente.

Ejemplo 17: Proceso de humanización por injerto CDR del anticuerpo 11E1

I - Humanización del dominio variable de cadena ligera

Comparación de la secuencia nucleotídica de 11E1 VL con genes de células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 11E1 VL se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGKV4-79*01 y IGKJ4*01 murinas con una identidad de secuencia de 98.58% para la región V y 97.22% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el usar directamente las secuencias 11E1 VL para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 38A para el gen V y 38B para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 11E1 VL con genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 11E1 VL, se ha buscado. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica de 11E1 VL se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT.

IGKV3-7*02 y IGKV3D-7*01 humanas con una identidad de secuencia tanto para ambos genes de células germinales de 69.86% para la región V, se han identificado. El gen de célula germinal humana IGKV3-7*02 se conoce en la base de datos IMGT como un "ORF" que significa que esta secuencia se ha encontrado en el genoma humano pero puede presentar ciertos problemas de recombinación que llevan a anticuerpos naturales derivados de IGKV3-7*02 no funcionales. De esta manera, el gen de célula germinal IGKV3D-7*01 se selecciona que recibe la región V humana para las 11E1 VL CDRs murinas.

Para la región J, la mejor calificación de homología se obtuvo primero con humano, IGKJ3*01 humana que muestra una identidad de secuencia de 78.38%. Pero un número superior de nucleótidos idénticos consecutivos y un mejor ajuste de aminoácidos se ha encontrado en el alineamiento con el gen de célula germinal IGKJ4*02 humana (identidad de secuencia de 75.68%). De esta manera, el gen de célula germinal IGKJ4*02 se elige que recibe la región J humana para las 11E1 VL CDRs murinas.

Alineamientos se representan en las Figuras 39A para la región V y 39B para la región J.

Para optimización de la selección, la persona con destreza en la técnica también puede hacer alineamientos entre las secuencias proteicas a fin de ayudarlo en la selección.

Versión humanizada de 11E1 VL

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales IGKV3D-7*01 y IGKJ4*02 y también las CDRs de la 11E1 VL murina a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 40, los residuos con negritas en la secuencia 11E1 VL corresponden a los treinta aminoácidos que se encuentran diferentes entre el dominio 11E1 VL y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGKV3D-7*01 y IGKJ4*02).

Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de anticuerpo o en la estructura CDR, la clase de aminoácido cambia entre residuos murinos y humanos, la localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cuatro de los treinta diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cuatro residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son murino L4 en humano M, Y40 en S, Y87 en F y T96 en P. Estos residuos de rango uno se ilustran en la Figura 40 como residuos con negritas en la secuencia 11E1 HZVL en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no son limitados sino deben ser considerados con mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, otras mutaciones pueden ser identificadas. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir los residuos 24 (S/R), 53 (W/L), 66 (I/T), 67 (L/R), 86 (S/D), 95 (Q/E), 99 (A/F) o 121 (E/D), en donde las mutaciones también pueden ser concebidas en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente no están limitados sino deben ser considerados como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, todos los otros dieciocho residuos rango tres entre los treinta diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán en forma individual o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 40 representa la 11E1 VL humanizada implementada con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

II - Humanización del dominio variable de cadena pesada

Comparación de la secuencia nucleotídica de 11E1 VH con genes de

células germinales murinas

Como una etapa preliminar, la secuencia nucleotídica de 11E1 VH se comparó con las secuencias de genes de células germinales murinas parte de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr>).

Los genes de células germinales IGHV1-7*01, IGHD4-1*01 e IGHJ3*01 murinas con una identidad de secuencia de 94.10% para la región V, 66.67% para la región D y 100% para la región J, respectivamente, se han identificado. Respecto a la identidad obtenida, se ha decidido el utilizar directamente las secuencias 11E1 VH para buscar homologías humanas.

Estos alineamientos se representan en las Figuras 41A para el gen V, 41B para el gen D y 41C para el gen J.

Comparación de la secuencia nucleotídica de 11E1 VH con genes de células germinales humanas

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con 11E1 VH. Para este objetivo, la secuencia nucleotídica de 11E1 VH se ha alineado con las secuencias de genes de células germinales humanas parte de la base de datos IMGT. Para optimización de la selección, se realizaron alineamientos entre las secuencias proteicas para buscar mejores homologías.

Estos dos métodos complementarios llevaron a la identificación de dos secuencias V humanas receptoras posibles para las 11E1 VH CDRs murinas. Alineamiento nucleotídico da el gen de célula germinal IGHV1-2*02 humana con una identidad de secuencia de 75.69%, mientras que el alineamiento proteico da el gen de célula germinal IGHV1-46* 01 humana con una identidad de secuencia de 71.10%.

Vale la pena notar que la region D pertenece estrictamente a la región CDR3 en el dominio VH. El proceso de humanización se basa en el enfoque de "injerto CDR". Análisis del gen D humano más cercano no es útil en esta estrategia.

Buscando homologías para la región J lleva a la identificación del gen de célula germinal IGHJ4*03 humana con una identidad de secuencia de 80.85%.

Buscando similitudes totales y alineamientos de secuencias, el gen de célula germinal IGHV1-46*01 V humana y el gen de célula germinal IGHJ4*03 J humana de esta manera se han seleccionado que reciben secuencias humanas para las 11E1 VH CDRs murinas.

Alineamientos se representan en las Figuras 42A para la región V y

42B para la región J.

Versión humanizada de 11E1 VH

Las siguientes etapas en el proceso de humanización consisten en enlazar las secuencias de genes de células germinales selectas IGHV1-46*01 e IGHJ4*03 y también las CDRs de la 11E1 VH murina a los marcos de estas secuencias de genes de células germinales.

Como se ilustra en la Figura 43, los residuos con negritas en la secuencia 11E1 VH, corresponden a los veintiséis aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 11E1 VH y los fragmentos humanos selectos (FR humano, es decir IGHV1-46*01 y IGHJ4*03).

Respecto a los varios criterios tales como su participación conocida en la interfase VH/VL, en enlace de antígeno o en estructura CDR, la clase de aminoácidos cambia entre residuos murinos y humanos, localización del residuo en la estructura 3D del dominio variable, cinco de los veintiséis diferentes residuos se han identificado mutados eventualmente. Estos cinco residuos definidos más importantes y mutaciones en sus contra-partes humanas son N40 murino en H humano, Y55 en I, D66 en S, A80 en R y K82 en T. Estos residuos rango uno se ilustran en la Figura 43 como residuos con negritas en la secuencia 11E1 HZVH en donde permanecen murinos.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse no están limitados sino que deben considerarse como mutaciones preferenciales.

Con el auxilio de un modelo molecular, pueden identificarse otras mutaciones. Pueden mencionarse los siguientes residuos rango dos, es decir residuos 53 (I/M), 71 (L/F), 76 (A/V), 78 (L/M) y 87 (A/V) en los que las mutaciones también pueden concebirse en otra modalidad preferida.

Por supuesto, los residuos anteriormente mencionados a probarse eventualmente no están limitados sino que deben considerarse como mutaciones preferenciales. En otra modalidad preferida, todos los otros dieciséis residuos rango tres entre los veintiséis diferentes aminoácidos pueden ser reconsiderados.

Todas las mutaciones anteriormente mencionadas se probarán individualmente o de acuerdo con diversas combinaciones.

La Figura 43 representa la 11E1 VH humanizada implementada con las mutaciones anteriormente mencionadas claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la mutación.

Ejemplo 18: Efecto de Mabs purificada en fosforilación c-Met

En el ejemplo 3, el efecto de Mabs anti-c-Met en fosforilación se estimó con sobrenadantes dosificados de cada hibridoma a evaluar. La prueba se ha realizado de nuevo con 11E1 y 224G11 Mabs purificadas que se han evaluado ya sea a una concentración final de 30 µg/ml (200 nM) o a un rango de dosis de 0.0015 a 30 µg/ml (0.01-200 nM) a fin de determinar la IC₅₀ de cada anticuerpo. El protocolo empleado es el mismo que aquel descrito en el ejemplo 3.

Los resultados de 3 experimentos independientes se presentan en la Figura 44 y demuestran que una vez purificadas 11E1 y 224G11 no exhiben efecto agonista cuando se agregan solas a células A549 y respectivamente 87 y 75% efecto antagonista en presencia de HGF. Como se espera 5D5 Mab introducido como un control positivo agonista mostró un significativo efecto agonista (58%) cuando se agrega sola y solo un efecto antagonista moderado (39%) en presencia de HGF. Respecto a cálculos de EC₅₀, tanto 11E1 como 224G11 tuvieron IC₅₀S nanomolares.

Ejemplo 19: Combinación *in vivo* de 224G11 y Navelbine® en modelo de xeno-injerto NCI-H441

Células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción estando en fase de crecimiento exponencial. Diez millones de células NCI-H441 se injertaron a ratones desnudos atímicos. Cinco días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab /ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón hasta el día 38 o con 3 inyecciones de Navelbine® (D5, D12, D19) a 8 mg/kg. Un tercer grupo administrado con el tratamiento combinado también se incluyó. Navelbine® se suministró por inyecciones i.p. El volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron cada día sobre el periodo de tratamiento de Navelbine®. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba t o una prueba Mann-Whitney. En este experimento, el volumen de tumor promedio de los grupos tratados de modalidad sencilla se reduce en 72%, 76% y 99.8% para 224G11, Navelbine® y Navelbine® + 224G11 respectivamente el día 41 post primera inyección. El día 41, la terapia combinada mejoró significativamente el crecimiento de tumor en comparación con los tratamientos de terapia sencillos ($p \leq 0.041$ comparado con Navelbine® solo y $p \leq 0.002$ comparado con 224G11 solo

el día 41), 4 de 6 ratones están sin tumor en el grupo de terapia combinada. Los resultados se representan en la Figura 45.

Estos resultados se confirmaron 50 días después del fin de los tratamientos (D88) en donde 66% de ratones que reciben el tratamiento combinado permanecieron libres de tumores.

Ejemplo 20: Combinación *in vivo* de 224G11 y Doxorubicina en modelo de xenoinjerto NCI-H441

Células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en fase de crecimiento exponencial. Diez millones de células NCI-H441 se injertaron en ratones desnudos atímicos. Cinco días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón o con 4 inyecciones de Doxorubicina (D5, D12, D19, D26) a 5 mg/kg. Un tercer grupo administrado con el tratamiento combinado también se incluyó. Doxorubicina se suministró por inyecciones i.v. El volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron todos los días durante el periodo de tratamiento con Doxorubicina. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba-t o una prueba Mann-Whitney. Tanto terapias sencillas como tratamiento combinado exhiben significativa actividad anti-tumor comparada con el grupo de control ($p \leq 0.002$ de D11 a D39). Los resultados se representan en la Figura 46.

Tratamiento combinado también demuestra una actividad de crecimiento anti-tumor significativa en comparación con un tratamiento de modalidad sencilla entre D11 y D39 indicando que hay un beneficio en combinar Doxorubicina con un tratamiento anti-c-Met.

Ejemplo 21: Combinación *in vivo* de 224G11 y Docetaxel en modelo de xenoinjerto NCI-H441

Células NCI-H441 de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en fase de crecimiento exponencial. Nueve millones de células NCI-H441 se injertaron en ratones desnudos atímicos. Cinco días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparables. Los ratones se trataron i.p. ya sea

con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón o con 4 inyecciones de Docetaxel (D5, D12, D19, D26) a 7.5 mg/kg. Un tercer grupo administrado con el tratamiento combinado también se incluyó. Docetaxel se suministró por inyecciones i.p. Volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron cada día durante el periodo de tratamiento con Docetaxel. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba-t o una prueba Mann-Whitney. Tanto terapias sencillas como tratamiento combinado exhibieron actividad anti-tumor significativa en comparación con el grupo de control ($p \leq 0.002$ de D11 a D35). Los resultados se representan en la Figura 47.

Tratamiento combinado también demostró una actividad de crecimiento anti-tumor significativa en comparación con tratamiento de modalidad sencilla entre D18 y D35 indicando que hay un beneficio en combinar Docetaxel con un tratamiento anti-c-Met.

Ejemplo 22: Combinación in vivo de 224G11 y Temozolomida en modelo de xenoinjerto U87MG

Células U87-MG de ATCC se cultivaron rutinariamente en medio DMEM, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en la fase de crecimiento exponencial. Cinco millones de células U87-MG se injertaron en ratones desnudos atímicos. Diecinueve días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaño de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón o con 3 inyecciones de Temozolomida (D19, D26, D33) a 5 mg/kg. También fue incluido un tercer grupo al que se le administró el tratamiento combinado. Temozolomida se suministra por inyecciones i.p. El volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$ y los pesos de animales se supervisaron cada día durante el periodo de tratamiento con Temozolomida. Análisis estadístico se realizó en cada tiempo medido utilizando ya sea una prueba-t o una prueba Mann-Whitney. Tanto las terapias sencillas como el tratamiento combinado exhiben significativa actividad anti-tumor, en comparación con el grupo de control ($p \leq 0.002$ de D22 a D32 (en donde ratones de control se sometieron a eutanasia por razones éticas)). Los resultados se representan en la Figura 48.

Tratamiento combinado también demuestra una actividad de crecimiento anti-tumor significativa en comparación con tratamientos de modalidad sencilla ($P \leq 0.002$ del día 22 al día 43 (en donde ratones de control se sometieron a eutanasia por razones de ética) para Temozolomida y del día 29 al día 53 (último día de tratamiento) para 224G11. Tomados en conjunto, estos datos indican que hay un beneficio en combinar Temozolomida con un tratamiento de anti-c-Met.

Ejemplo 23: Formación de esferoide

Como ya se describió en el Ejemplo 9 para otras Mabs, evaluamos la capacidad de 224G11 Mab para inhibir el crecimiento de tumor *in vitro* en el modelo de esferoide U87-MG. Para este propósito, células U87-MG desarrolladas como una monocapa se desprendieron con tripsina-EDTA y resuspendieron en medio de cultivo de células completas. Se iniciaron esferoides por inoculación de 625 células en pozos sencillos de fondo redondo, 96 placas en DMEM-FCS al 2.5%. Para impedir adhesión celular a un substrato, las placas fueron revestidas previamente con polyHEMA en etanol al 95% y secaron al aire a temperatura ambiente. Las capas se incubaron bajo condiciones de cultivo celular estándar a 37 grados C, CO₂ al 5% en incubadoras humidificadas. Anticuerpos monoclonales purificados (10 µg/ml) se agregaron después de 4 y 10 días de cultivo esferoide. Los esferoides se mantuvieron en cultivo por 17 días. Después, el crecimiento de esferoides se supervisa al medir el área de esferoides utilizando el módulo de auto-medida (automeasure) del programa axiovision. El área se expresó en µm². 8-16 esferoides se evaluaron por cada condición. El tamaño de esferoides se midió antes de adición de anticuerpos, después de 10 días de cultivo y después de 17 días de cultivo.

En estas condiciones, se obtuvieron esferoides homogéneos y no se observó diferencia estadística antes de adición de anticuerpos (Figura 49A).

Como se ilustra en las Figuras 49B-49D, el control de isotipo, 9G4 no afectó el crecimiento de esferoides después de 10 o 17 días de cultivo. Mientras que la adición de 5D5 no tuvo efecto mayor en tamaño de esferoide, la adición de cualquiera de 224G11 y 11E1 inhibió marcadamente el crecimiento de tumor.

Ejemplo 24: Actividad *in vitro* de formas quiméricas y humanizadas de 224G11 en el ensayo fosfo-c-Met

A fin de comparar la eficacia *in vitro* de formas murina, quimérica y humanizada en un ensayo funcional, sobrenadantes de cultivo que resultan de hibridoma 224G11 y células transfectadas HEK293 se dosificaron y probaron como se describe en el Ejemplo 3. Datos resumidos en la Figura 50, mostraron

los resultados esperados para el anticuerpo murino no purificado como ya se describió en la Figura 6B. Tanto anticuerpos no purificados quiméricos como humanizados exhibieron una actividad comparable ya sea cuando se agregan solos (Figura 50A) o cuando se incuban en la presencia de HGF (Figura 50B).

Ejemplo 25: Determinación de constantes de afinidad (KD) de anticuerpos anti-c-Met por análisis de Biacore

La afinidad de enlace de anticuerpos 11E1 y 224G11 purificados se investigó por BIAcore X utilizando Dominio c-Met-Extra-Celular Recombinante (ECD) fusionado a un dominio IgG1 Fc humano (R&D Systems) como antígeno (MW = 129 kDa). Como ambas proteínas de fusión c-Met-Fc y anticuerpos son compuestos bivalentes, fragmentos Fab de mAbs 11E1 y 224G11 (MW = 50 kDa) se generaron por corte con papaína, purificaron y utilizaron en este ensayo para evitar interferencia con parámetro de avidéz. Para el ensayo, un anticuerpo de captura anti-Tag histidina se revistió en chips-sensores CM5. El amortiguador de corrida fue HBS-EP, el gasto de flujo fue 30 µl/min y la prueba se realizó a 25 grados C. Antígeno c- Met (ECD_M1)2-Fc-(HHHHHH)2 soluble se capturó en el chip-sensor (alrededor de 270 RU), y los anticuerpos a probar se utilizaron en solución como analitos. El chip-sensor se regeneró utilizando amortiguador Glicina, HCl pH 1.5 en ambas células de flujo por medio minuto.

La Figura 51 ilustra el principio de este análisis. Los parámetros cinéticos resultantes se resumen en la siguiente tabla 4. Indican que ambos anticuerpos 11E1 y 224G11 anti-c-Met ligan la proteína de fusión c-Met-Fc recombinante con afinidades comparables en el intervalo de aproximadamente 40 pM.

Tabla 4

	K_{on1} $\times 10^{-6}$ [1/M.s]	K_{on1} $\times 10^{-6}$ [1/M.s]	Vida media [h]	K [pM]
11E1 Fab	1.13±0.01	4.68±0.001	4.1	41.4±0.5
224G11 Fab	2.04±0.01	7.79±0.40	2.5	34.8±1.9

Ejemplo 26: Actividad *in vivo* de 224G11 en células MDA-MB-231 co-implantadas con células MRC5 como una fuente de HGF humano en ratones desnudos Atímicos

Células MDA-MB-213 y MRC5 de ATCC se cultivaron ambas en medio DMEM, FCS al 10%, L-Glutamina al 1%. Las células se dividieron dos días antes de inserción en la fase de crecimiento exponencial. Cinco millones de células MDA-MB-231 y 500 000 células MRC5 se co-inyectaron s.c. en ratones desnudos Atímicos. Doce días después de implante, los tumores se pudieron medir y los animales se dividieron en grupos de 6 ratones con tamaños de tumor comparable. Los ratones se trataron i.p. ya sea con una dosis de carga de 2 mg de 224G11 Mab/ratón y después dos veces a la semana con 1 mg de anticuerpo/ratón. Volumen de tumor se midió dos veces a la semana y calculó por la fórmula: $\pi/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$.

Resultados descritos en la Figura 52 mostraron una diferencia significativa en crecimiento de tumores medios de ratones tratados con 224G11, en comparación con el grupo de control.

Ejemplo 27: Elementos complementarios en humanización de anticuerpos 227H1, 11E1 y 224G11

Procedimiento General

Humanización de los anticuerpos anti-cMet se realizó independientemente de cada cadena y secuencialmente respecto a los aminoácidos analizados en cada dominio variable. El proceso de humanización se evalúa en un primer intento en un ensayo de enlace basado en ELISA con Fc-cMet recombinante; las actividades de enlace de los anticuerpos humanizados se comparan con el anticuerpo quimérico recombinante. En un segundo intento, anticuerpos humanizados anti-cMet se evaluaron por sus habilidades para desplazar el enlace Fc-cMet en HGF recombinante revestido con plástico; este ensayo de competencia permite la comparación directa de versiones murina, quimérica y humanizada de los anticuerpos anti-cMet.

En las Figuras 53 y 54 se ejemplifican las actividades de enlace anti-cMet típicas de anticuerpos monoclonales murinos 227H1, 11E1 y 224G11.

La Figura 53 muestra actividades de enlace directo anti-cMet de anticuerpos murinos purificados detectados. En este ensayo, anticuerpos anti-cMet monoclonales murinos exhiben diferentes actividades de enlace anti-cMet diferentes pero todavía dependientes de dosis.

La Figura 54 muestra las actividades de competencia de enlace HGF-cMet de anticuerpos murinos purificados. El ensayo de competencia revela diferencias confiables entre estos anticuerpos monoclonales anti-cMet con una actividad moderada, no completa pero confiable competitiva para anticuerpo

monoclonal 11E1, mientras que 224G11 y 227H1 murinos exhiben un patrón similar de actividades de competencia con un 100% de máximo de desplazamiento de enlace HGF a alta concentración de anticuerpo. El anticuerpo monoclonal 224G11 muestra el mejor valor IC_{50} .

Vale la pena notar que las actividades de enlace directo de los anticuerpos murinos no reflejan sus propiedades competitivas de enlace HGF intrínsecas.

Estos dos ensayos se emplearon para caracterizar las versiones quimérica y humanizada recombinantes de los anticuerpos anti-cMet murinos. Para este objetivo, brevemente, dominios variables anti-cMet, ya sean murinos o humanizados, se clonaron en las series de vectores de expresión pCONplus de LONZA y anticuerpos derivados IgG₁/k recombinantes se expresaron en células CHO. Sobrenadantes de cultivo de expresión se concentraron y dialisaron extensamente contra PBS y después dosificaron para concentraciones de anticuerpos expresados y directamente emplearon para estimar las actividades de enlace anti-cMet correspondientes. Se estimaron tanto ensayos de enlace directo como competencia de HGF para caracterizar mejor las versiones quiméricas o humanizadas recombinantes.

Ejemplo 27-1: Humanización de dominio variable de cadena pesada 227H1

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhiben la mejor identidad con la secuencia murina 227H1 VH. Con el auxilio de la base de datos IMGT, el gen de célula germinal IGHV1-2*O2 V humana y el gen de célula germinal IGHJ4*01 J humana de esta manera se han seleccionado que reciben las secuencias humanas para las 227H1 VH CDRs murinas.

La Figura 55 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 227H1 VH murino con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo se ilustra el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VH murino 227H1. Las filas HZ3VH, HZ2VH y HZ1VH corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio 227H1 VH con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila "cambiada") claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

En una primer serie de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de las tres primeras versiones humanizadas del dominio VH murino 227H1 cuando se expresan en combinación con la cadena

ligera quimérica 227H1. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 56. En este experimento, no se observaron diferencias en las capacidades de enlace de los anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados 227H1 probados. En este punto, 26 de los 32 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 227H1 VH murino y el marco humano selecto se han analizado y no se encontraron relevantes para actividad de enlace anti-cMet del dominio VH humanizado 227H1, cuando se combinan con la cadena ligera quimérica.

En conjunto con un análisis de mutagénesis dirigida por sitio de los últimos seis residuos murinos en la versión humanizada HZ1VH del dominio 227H1 VH, construimos una versión original HZ4VH "totalmente humanizada-IMGT" y se probaron sus propiedades de enlace anti-cMet. Los resultados se dan en la Figura 57 para el ensayo de enlace directo y en la Figura 58 para el ensayo de competencia de enlace HGF. Vale la pena notar que ambas versiones recombinantes quimérica y humanizada 227H1 exhiben una mejor actividad competitiva que el anticuerpo murino paternal.

Sin embargo, dados los datos experimentales obtenidos respecto a las propiedades de enlace anti-cMet del dominio 227H1 VH humanizado "completo-IMGT", la secuencia de aminoácidos resultante ilustrada en la Figura 59 se eligió y un análisis bioinformática se realizó para evaluar el nivel de calidad o carácter humano (humaness) del dominio variable humanizado 227H1-HZ VH así denominado.

Para este objetivo, una comparación simple de las secuencias marco a la base de datos humana, se realizó utilizando las herramientas IMGT. Dado el nivel de humanización que alcanzamos durante este proceso, de los 89 aminoácidos analizados correspondientes a los residuos marco, 89 se encontraron confiables con un origen humano. Solo residuos de las CDRs pueden encontrarse diferentes, pero de ser así son diferentes del gen de célula germinal humana correspondiente, y evidentemente en posiciones hipervariables. Con base en el sistema de numeración IMGT y las herramientas de análisis de homología, primero humanizamos totalmente un dominio variable de anticuerpo de origen murino.

Ejemplo 27-2: Humanización de anticuerpo monoclonal 11E1

I - Humanización de dominio variable de cadena pesada 11E1

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto de CDR, el gen de línea celular germinal humana que exhibe la mejor identidad con la

secuencia murina 11E1 VH se ha buscado. Con el auxilio de la base de datos IMGT, el gen de célula germinal IGHV1-46*01 V humano y gen de célula germinal IGHJ4*03 J humano de esta manera se han seleccionado como secuencias receptoras humanas para las 11E1 VH CDRs murinas.

La Figura 60 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 11E1 VH murino con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo el aminoácido que se encontró diferente del dominio VH murino 11E1 se ilustra. Las filas HZ VH3, HZ VH2 y HZ VH1 corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio 11E1 VH con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila "cambiada"), claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación.

En una primer serie de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de las tres primeras versiones humanizadas del dominio VH murino 11E1 cuando se expresan en combinación con la cadena ligera quimérica 11E1. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 61. En este experimento, se observó una capacidad de enlace similar de anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados de 11E1 probados. En este punto, 19 de los 24 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 11E1 VH murino y el marco humano selecto, se han analizado y se han encontrado que no son relevantes para actividad de enlace anti-cMet del dominio VH humanizado 11E1 cuando se combinan con la cadena ligera quimérica.

II - Humanización de dominio variable de cadena ligera 11E1

A fin de identificar el mejor candidato humano para el injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humano que exhibe la mejor identidad con la secuencia murina 11E1 VL. Con el auxilio de la base de datos IMGT, el gen de célula germinal IGKV3D-7*01 V humano y el gen de célula germinal IGKJ4*01 J humano, de esta manera se han seleccionado como secuencias humanas receptoras para las 11E1 VL CDRs murinas.

La Figura 62 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 11E1 VL murino con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VL murino 11E1 se ilustra. Las filas HZ VL3, HZ VL2 y HZ VL1 corresponden a versiones humanizadas implementadas del dominio 11E1 VL con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila "cambiada") claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará la

mutación.

En una primer serie de experimentos, se construyen y analizan las actividades de enlace anti-cMet de las tres primeras versiones humanizadas del dominio VL murino 11E1 cuando se expresa en combinación con la cadena pesada quimérica 11E1. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 63. En este experimento, observamos capacidades de enlace similares de los anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados 11E1 probados. En este punto, 26 de los 30 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 11E1 VL murino y el marco humano selecto, se han analizado y no se han encontrado relevantes para la actividad de enlace anti-cMet del dominio VL humanizado 11E1, cuando se combinan con la cadena pesada quimérica.

III - Humanización de anticuerpo 11E1

En esta etapa de la humanización de anticuerpo monoclonal 11E1, la secuencia de anticuerpos humanizada resultante teórica contiene solo cinco residuos de CDRs externos que tienen un dominio VH murino paternal y cuatro residuos CDRs externos que provienen de la secuencia VL murina paternal (ver Figura 60, fila HZ VH1 y Figura 62, fila HZ VL1). Se ha decidido entonces caracterizar inmediatamente la versión humanizada de cadena pesada y ligera combinada resultante del anticuerpo 11E1. Los resultados se dan en la Figura 64 para el ensayo de enlace directo anti-cMet.

En este experimento, se han observado capacidades de enlace similares para los anticuerpos recombinantes humanizados o quiméricos derivados de 11E1 probados. Análisis de las propiedades competitivas de enlace HGF y análisis de mutagénesis dirigida por sitio de la contribución de los nueve residuos murinos izquierdos restantes para realizarse independientemente o en combinación en esta versión VH1/VL1 "pre-humanizada" del anticuerpo monoclonal 11E1.

Ejemplo 27-3: Humanización de anticuerpo monoclonal 224G11

I - Humanización de dominio variable de cadena pesada 224G11

A fin de identificar el mejor candidato humano para injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con la secuencia murina 224G11 VH.

Respecto a la homología de alta secuencia entre las secuencias de dominio 224G11 y 227H1 VH y como se confirma por el uso de las herramientas de la base de datos IMGT, el mismo gen de célula germinal IGHV1-2*02 V

humano y el gen de célula germinal IGHJ4*01 J humano de esta manera se han seleccionado como las secuencias humanas receptoras para las 224G11 VH CDRs murinas.

Con base en esta alta homología, se ha decidido el transferir directamente las informaciones de humanización ganadas de la humanización de dominio 227H1 VH (ver Ejemplo 27) y diseñamos de esta manera una versión humanizada de "completa-IMGT" como se ilustra en la Figura 65, que representa un alineamiento de aminoácidos de los dominios 227H1 y 224G11 VH murinos con el marco humano selecto. En la fila de FR humano, solo se ilustra el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VH murino 224G11. La fila HZVHO corresponde a la versión humanizada "completo-IMGT" del dominio 224G11 VH como se obtiene para el dominio 227H 1 -HZVH "completo-IMGT".

La versión humanizada "completo-IMGT" del dominio VH murino 224G11 de esta manera se ha construido y sus actividades de enlace anti-cMet se analizaron, cuando se expresan en combinación con la cadena ligera quimérica 224G11. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 66, mientras que la Figura 67 ilustra el ensayo de competencia de enlace HGF. Dados los datos experimentales obtenidos respecto a las propiedades de enlace anti-cMet del dominio 224G11 VH humanizado "completo-IMGT", la secuencia de aminoácidos resultante como se ilustra en la Figura 65, se elige y se realiza entonces un análisis bioinformático para evaluar el nivel de "calidad o carácter humano" del dominio 224G11-HZ VHO así denominado.

Dada la estrategia de humanización aquí aplicada, debe de referirse al Ejemplo 27 para el análisis de calidad/carácter humano de la secuencia 224G11 HZ VHO. Como se describe para la humanización de dominio 227H1 VH, confirmamos la confiabilidad del sistema de numeración IMGT y las herramientas de análisis de homología y también se demuestra la posibilidad de transferir la estrategia de humanización entre anticuerpos bajo los límites de su homología intrínseca.

II - Humanización de dominio variable de cadena ligera 224G11

A fin de identificar el mejor candidato humano para injerto CDR, se ha buscado el gen de célula germinal humana que exhibe la mejor identidad con la secuencia murina 224G11 VL. Con el auxilio de las herramientas de análisis de la base de datos IMGT, se identificaron dos regiones V humanas receptoras para las 224G11 VL CDRs murinas. De esta manera, dos estrategias de humanización se

han planeado para el dominio 224G11 VL. La primera corresponde a una prueba inicial para un marco humano con una longitud CDR1 más corta (IGKV3-11*01), la segunda con una longitud CDR1 más larga (IGKV4-I*01).

La Figura 68 representa un alineamiento de aminoácidos del dominio 224G11 VL murino con los dos fragmentos humanos selectos. En ambas filas FR Hu-FR más corta y más larga, solo se ilustra el aminoácido que se encuentra diferente del dominio VL murino 224G11. Las filas HZ VL3 y HZ VL6 corresponden a versiones humanizadas básicas del dominio 224G11 VL con las mutaciones anteriormente mencionadas (fila de "rango") claramente identificadas. El número bajo cada mutación propuesta corresponde al rango en el cual se realizará dicha mutación cuando se elige el marco CDR1 básico "más corto" o "más largo".

En un primer conjunto de experimentos, las dos versiones humanizadas básicas del dominio VL murino 224G11 se construyeron y sus actividades de enlace anti-cMet se analizaron, cuando se expresan en combinación con la cadena pesada quimérica 224G11. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 69. En este experimento, una actividad de enlace anti-cMet similar se observa para la versión quimérica y HZ VL6 ("CDR1 más largo") mientras que casi no se detecta enlace para el anticuerpo derivado 224G11 recombinante HZ VL3 ("CDR1-más corto").

En un segundo juego de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de las versiones humanizadas implementadas del dominio 224G11 VH derivado de HZ VL6 cuando se expresa en combinación con la cadena pesada quimérica 224G11. Dos formas humanizadas adicionales se analizaron; en la versión HZ VL5, los siete residuos del tercer grupo (rango 3) son humanizados y en la versión HZ VL4, los cuatro residuos izquierdos del primer grupo (residuos rango 1) solo permanecieron murinos. Resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 70. En este experimento, no se observaron diferencias en las capacidades de enlace de los anticuerpos recombinantes parcialmente humanizados o quiméricos derivados de 224G11 probado. En este punto, 18 de los 22 aminoácidos que se encontraron diferentes entre el dominio 224G11 VL murino y el marco humano "CDR1-más largo" selecto se han analizado y no se han encontrado relevantes para la actividad de enlace anti-cMet del dominio VL humanizado 224G11, cuando se combinan con la cadena pesada quimérica.

Se ha probado la versión humanizada HZ VL4 del dominio 224G11

VL en el ensayo de competencia de enlace HGF. Como se muestra en la Figura 71, los resultados obtenidos demuestran la actividad competitiva similar de anticuerpos derivados de 224G11 humanizados HZ VL4 y quiméricos recombinantes y murinos.

En esta etapa de la humanización del dominio 224G11 VL, la secuencia resultante contiene solo cuatro residuos externos CDRs que provienen de la secuencia paternal murina. Como se muestra en la Figura 72, estos cuatro residuos etiquetados § son L4, M39, H40 y R84.

Con base en el sistema de numeración IMGT y en las herramientas de análisis y homología, demostramos que el marco humano que exhibe diferencias estructurales en términos de longitud de CDR todavía puede ser adecuado en un proceso de humanización. Se ha decidido entonces el caracterizar las versiones humanizadas de cadena ligera y pesada resultantes del anticuerpo 224G11. Análisis de mutagénesis dirigida por sitio de la contribución de los cuatro residuos murinos restantes se realiza entonces cuando se expresa en combinación con la versión humanizada VHO de la cadena pesada.

III - Humanización de anticuerpo 224G11

En una primera serie de experimentos, construimos y analizamos las actividades de enlace anti-cMet de la versión totalmente humanizada del anticuerpo 224G11. Esta versión recombinante abarca ambos dominios VH y VL humanizados VHO y VL4 respectivamente. Los resultados obtenidos del ensayo de enlace directo anti-cMet se muestran en la Figura 73. En este experimento, la actividad de enlace anti-cMet 224G11 totalmente humana, se encuentra similar a la de las versiones 224G11 recombinante quimérica y humanizada de "cadena sencilla".

Se ha probado entonces la versión totalmente humanizada del dominio 224G11 VL en el ensayo de competencia de enlace HGF. Los resultados obtenidos como se muestra en la Figura 74, demuestran la actividad competitiva similar de anticuerpos derivados 224G11 totalmente humanizados y quiméricos recombinantes y murinos paternos.

En esta etapa de la humanización de anticuerpo 224G11, la secuencia resultante contiene solo cuatro residuos CDRs externos que provienen de la secuencia de dominio variable de cadena ligera paternal murina. Analizamos entonces variantes sencillas de mutagénesis dirigida por sitio del dominio VL humanizado VL4 cuando se expresa en combinación con la versión humanizada VHO de la cadena pesada. Como se ejemplifica en la Figura 75 para el ensayo de

enlace directo, identificamos residuos relevantes potenciales entre los cuatro probados, que son M39 y H40.

Se ha decidido el analizar múltiples mutantes del dominio 224G11 VL humanizado HZ VL4 cuando se expresan en combinación con el dominio 224G11 VH humanizado HZ VH0. Como se muestra en la Figura 76 para el ensayo de enlace directo y en la Figura 77 para el ensayo de competencia de enlace HGF, múltiples mutantes aminoácidos del dominio variable VL4 se analizaron para identificar la mejor combinación humanizada. Con base en el análisis de mutantes sencillo, se ha enfocado en mutantes dobles y triples que pueden exhibir las mejores actividades anti-cMet. El mutante VH0/VL4-2x corresponde al dominio VH humanizado HZ VH0 224G11 expresado con el dominio VL humanizado HZ VL4 224G11 con la doble mutación L4M/R84G. El mutante VH0/VL4-3x corresponde al dominio VH humanizado HZ VH0 224G11 expresado con el dominio VL humanizado HZ VL4 224G11 con la mutación triple L4M/M39L/R84G.

Dados los datos experimentales obtenidos respecto a las propiedades de enlace anti-cMet del anticuerpo 224G11 totalmente humanizado, el análisis bioinformático de ambas secuencias de dominios variables de cadena ligera y pesada, se realiza para evaluar el nivel de "calidad/carácter humano" de las versiones mejor humanizadas VH0/VL4-2x y VH0/VL4-3x. Se ha demostrado previamente la humanización "completa-IMGT" del dominio VH0 224G11 VH. Respecto al nivel de "calidad/carácter humano" de las versiones de dominio VL humanizadas VL4-2x y -3x 224G11, solo contienen residuos murinos M39 y/o H40. Estos dos residuos clave potenciales se ubican al final de CDR1, M39 es el ancla CDR N-terminal. Dado el problema de longitud de CDR que enfrentamos durante la humanización del dominio 224G11 VL, y considerando estas posiciones como parte de la definición Kabat de VL CDR1, el nivel de "calidad/carácter humano" del anticuerpo 224G11 totalmente humanizado deberá exhibir una fuerte inmunogenicidad reducida debido a los residuos murinos conservados mínimos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso para la selección de anticuerpos anti c-Met capaces de inhibir tanto activación dependiente-de-ligando como independiente-de-ligando de c-Met. Más particularmente, el proceso se basa en la inhibición de la dimerización de c-Met. En otro aspecto, la presente invención se refiere a dichos anticuerpos y composiciones que comprenden a dichos anticuerpos para la preparación de un medicamento para tratar cáncer. Son también parte de la invención procesos y equipos de diagnóstico.

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

1. Proceso para la selección de un anticuerpo anti c-Met, o uno de sus "fragmentos divalentes" o "derivados" funcionales, capaz de inhibir la activación de c-Met dependiente de ligando e independiente de ligando, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - i) cribado de los anticuerpos generados y selección de anticuerpos capaces de unirse específicamente a c-Met;
 - ii) evaluación *in vitro* de los anticuerpos seleccionados en la etapa i) y selección de anticuerpos capaces de inhibir al menos el 50% de la proliferación celular tumoral para al menos un tipo de tumor; y luego
 - iii) ensayo de los anticuerpos seleccionados en la etapa ii) y selección de anticuerpos capaces de inhibir la dimerización de c-Met.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa iii) consiste en la evaluación de anticuerpos por análisis BRET en células que expresan c-Met-RLuc/c-Met-YFP, y selección de anticuerpos capaces de inhibir al menos 30%, de la señal BRET.
3. Un anticuerpo aislado, o uno de sus "fragmentos divalentes" o "derivados" funcionales, capaz de ser obtenido por un proceso como se reivindica en la reivindicación 1 o 2.
4. Un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse a cMet e inhibir la activación de c-Met dependiente de ligando e independiente de ligando, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende los CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias SEQ ID Nos: 56, 57 y 58, respectivamente; y una cadena ligera que comprende los CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias SEQ ID Nos: 59, 60 y 61, respectivamente.
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 62.
6. El anticuerpo de la reivindicación 3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque comprende una cadena ligera de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 63.

7. El anticuerpo de la reivindicación 4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 62 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 63.
8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque consiste en un anticuerpo monoclonal.
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico y comprende, además, las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón.
10. El anticuerpo quimérico de la reivindicación 9, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque dicha especie heteróloga es el hombre.
11. El anticuerpo quimérico de la reivindicación 10, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, caracterizado porque es un anticuerpo humanizado y porque las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano son, respectivamente, para la cadena ligera la región kappa y para la cadena pesada la región gamma-1, gamma-2 o gamma-4.
12. Un hibridoma murino depositado en la CNCM, Instituto Pasteur, París, el 14 de marzo de 2007, bajo el número I-3724.
13. Un ácido nucleico aislado, caracterizado porque se selecciona de los siguientes ácidos nucleicos:
 - a) una secuencia de ácido nucleico que comprende las secuencias SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 y las secuencias SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69; y
 - b) una secuencia de ácido nucleico que comprende las secuencias SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 71;
 - c) los correspondientes ácidos nucleicos de ARN de los ácidos nucleicos tal como se definen en b) o c);

- d) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos tal como se definen en a), b) y c).
14. Una composición que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o producido por el hibridoma de acuerdo a la reivindicación 12.
15. La composición de la reivindicación 14, caracterizada porque comprende, además, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un anticuerpo anti-tumoral.
16. La composición de la reivindicación 14, caracterizado porque comprende, además, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o secuencial, un agente citotóxico/citostático.
17. La composición de la reivindicación 14, caracterizado porque uno, al menos, de dichos anticuerpos, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.
18. La composición de la reivindicación 16 o 17, caracterizado porque dicho agente citotóxico/citostático o dicha toxina y/o un radioelemento se acopla químicamente a al menos uno de los elementos de dicha composición para uso simultáneo.
19. La composición de la reivindicación 14, en donde dicho anticuerpo se acopla químicamente a un agente citotóxico/citostático.
20. La composición de la reivindicación 19, en donde dicho agente citotóxico/citostático se selecciona en el grupo que consiste en agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos anti-tumor, inhibidores mitóticos, inhibidores de la función de la cromatina, agentes anti-angiogénesis, agentes anti-estrogénicos, anti- agentes andrógenos o inmunomoduladores.
21. La composición de la reivindicación 19 o 20, en donde dicho agente citotóxico/citostático es un inhibidor de la mitosis.

22. 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, caracterizado porque dicho método comprende poner en contacto la muestra biológica *in vitro* con un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o producido por el hibridoma de la reivindicación 12, siendo posible que dicho anticuerpo sea, si es necesario, marcado.

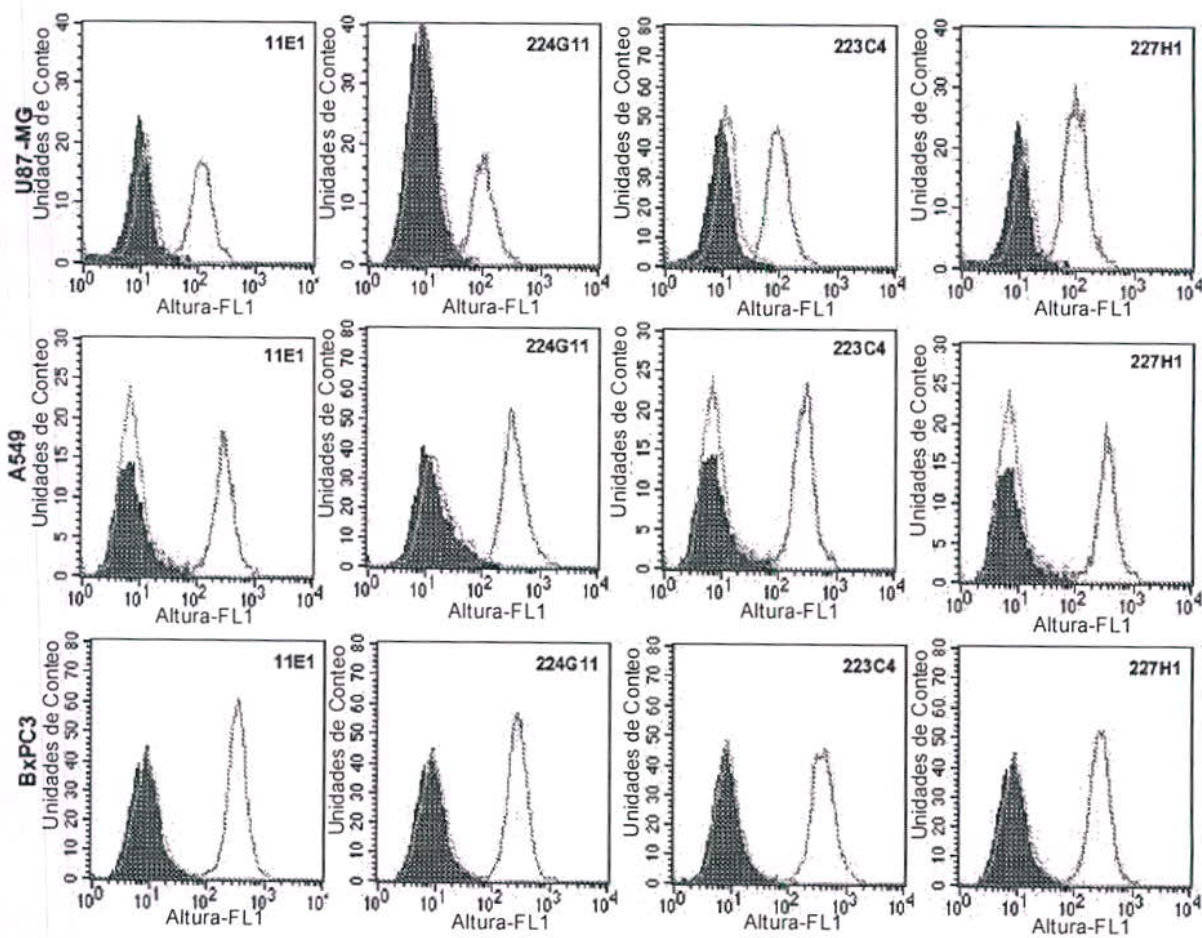


FIGURA 1

207

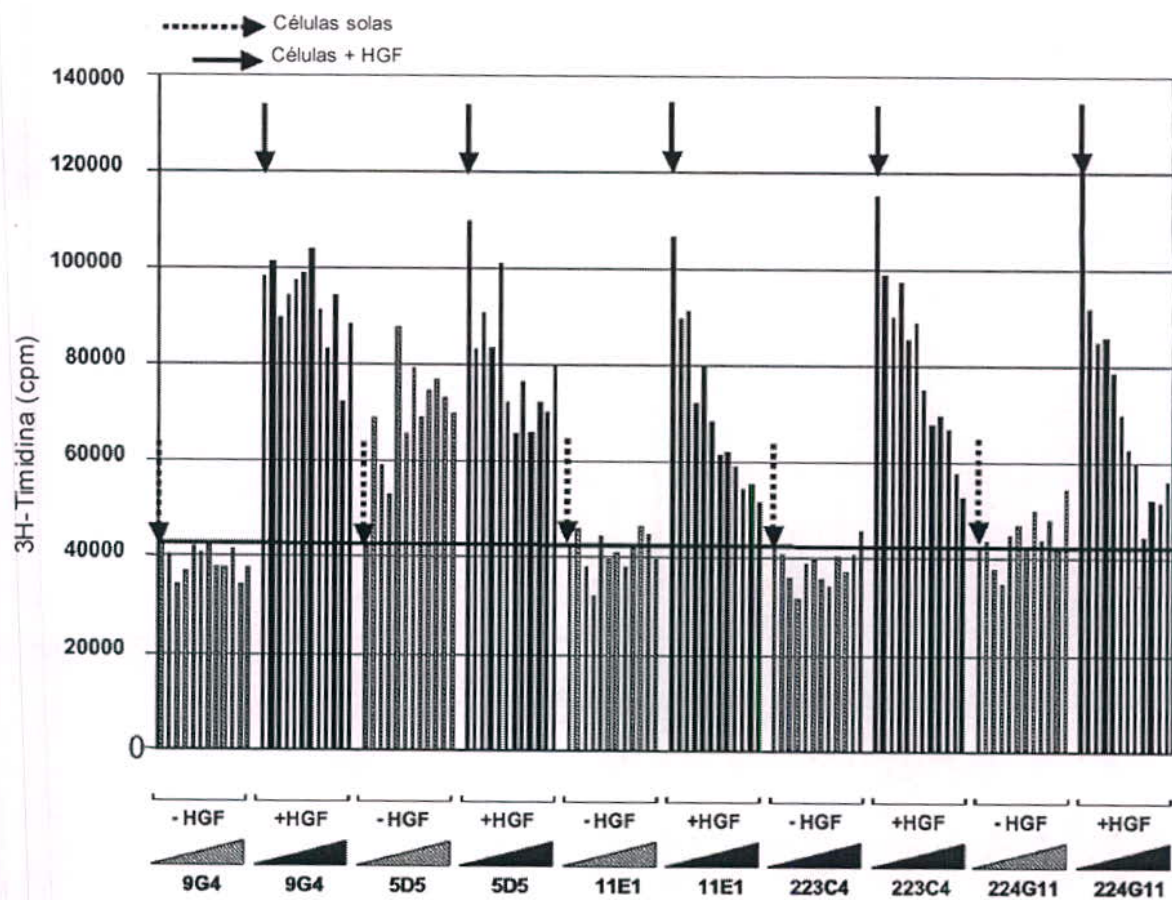


FIGURA 2A

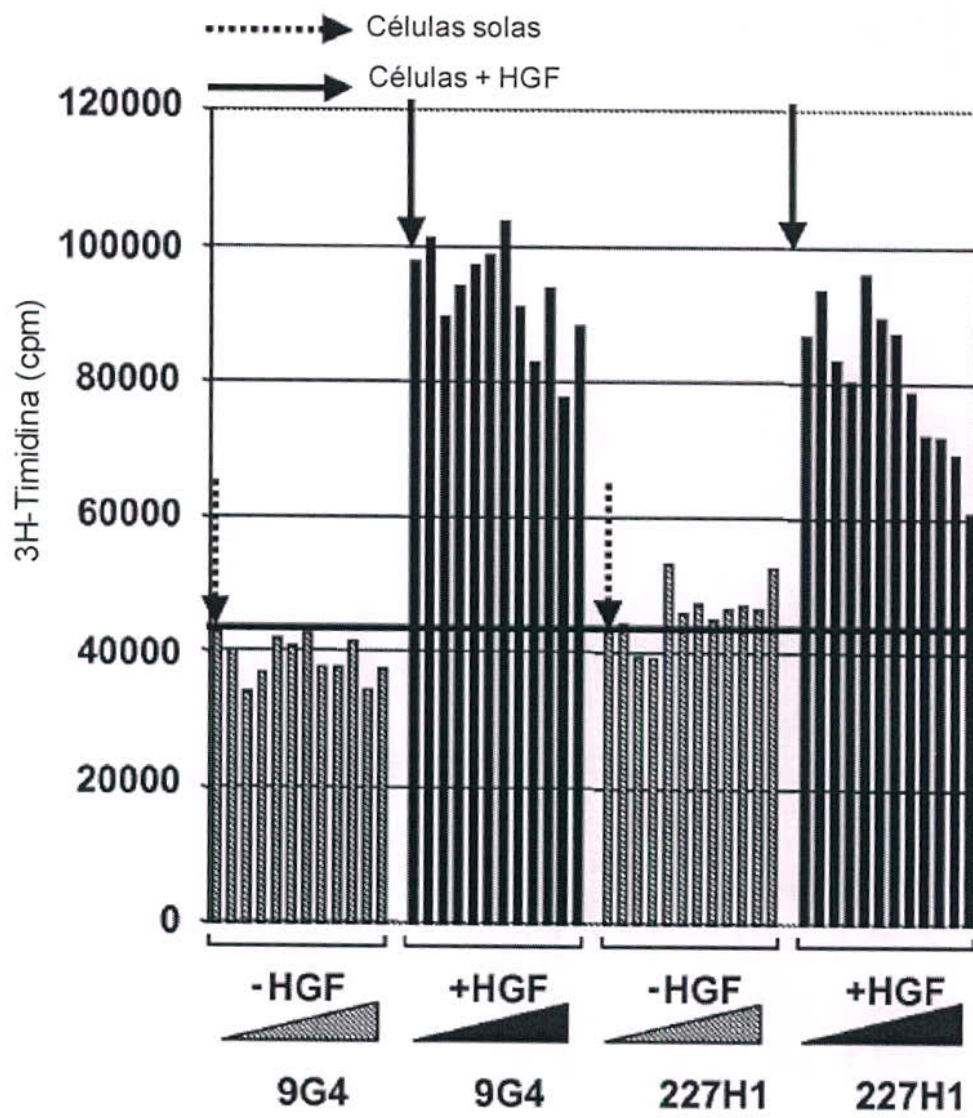


FIGURA 2B

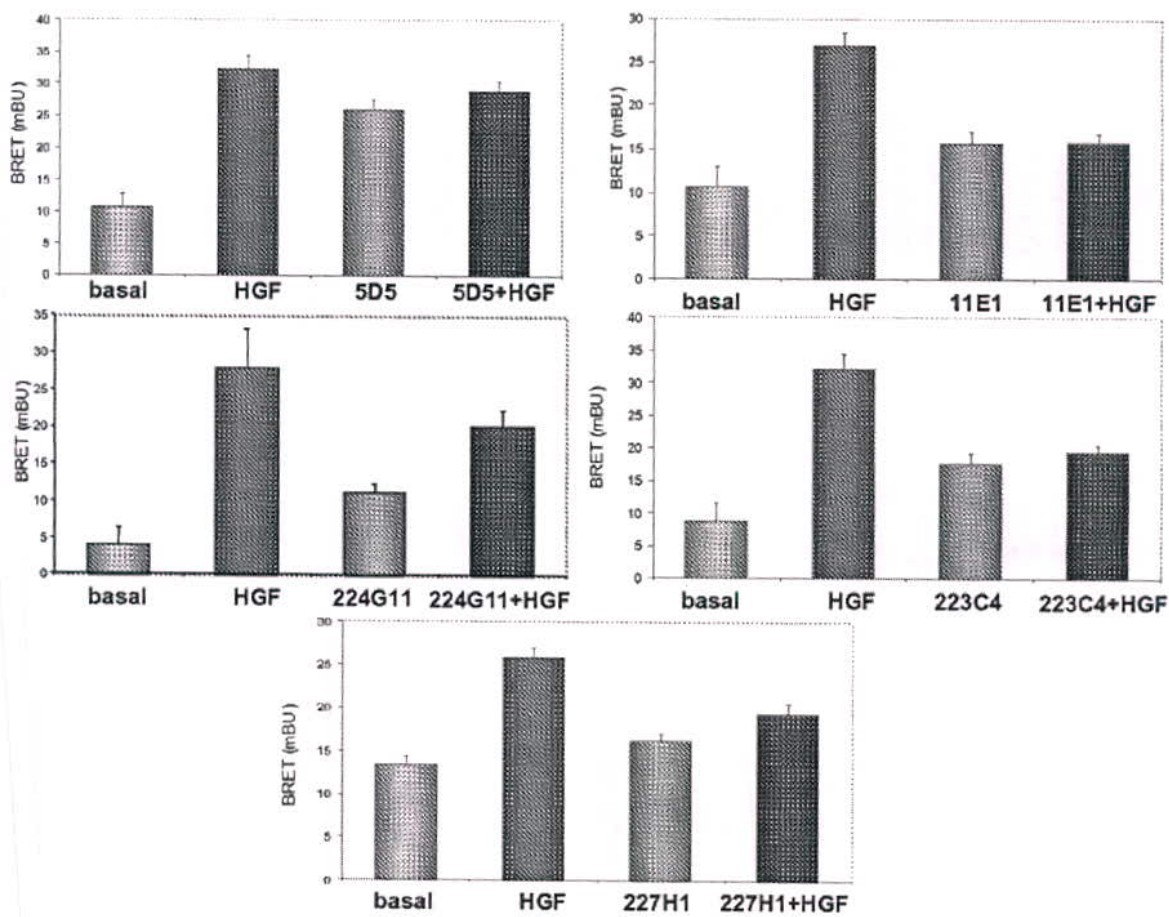


FIGURA 3

5/72

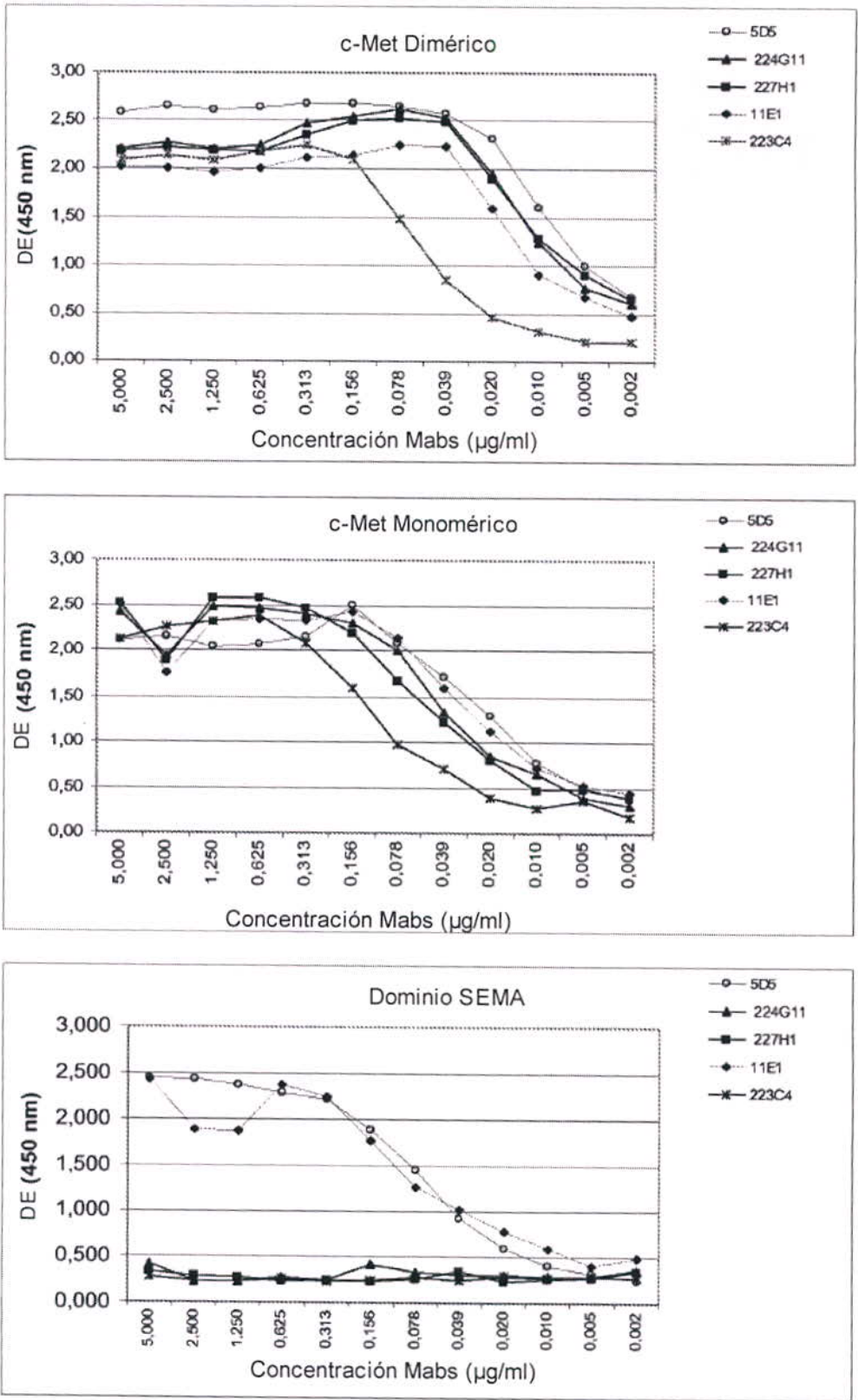


FIGURA 4

107

6/72

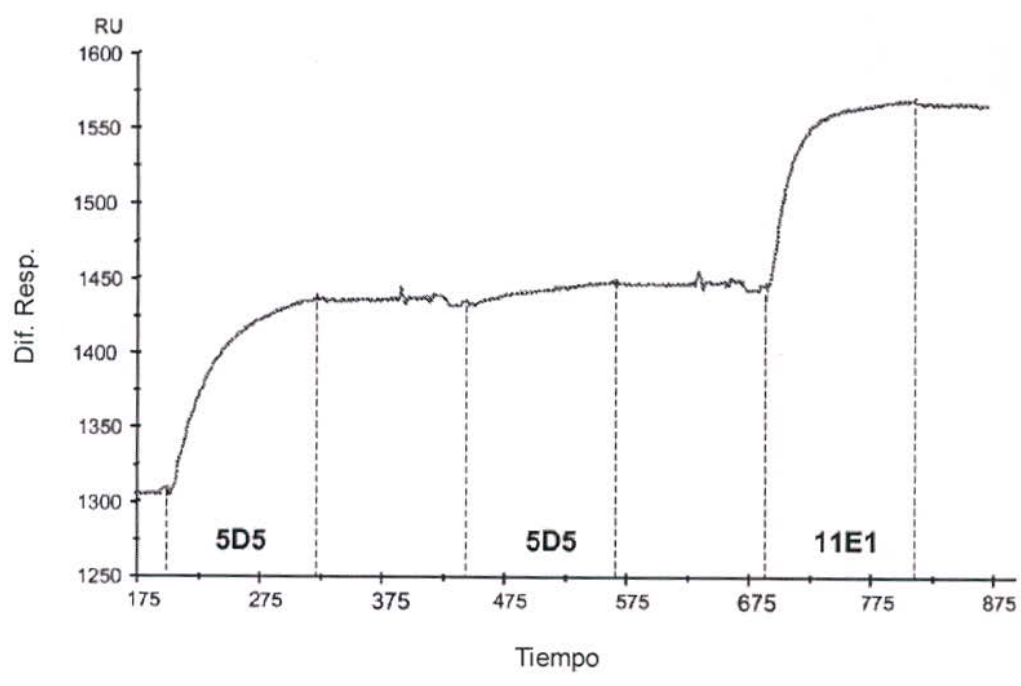


FIGURA 5A

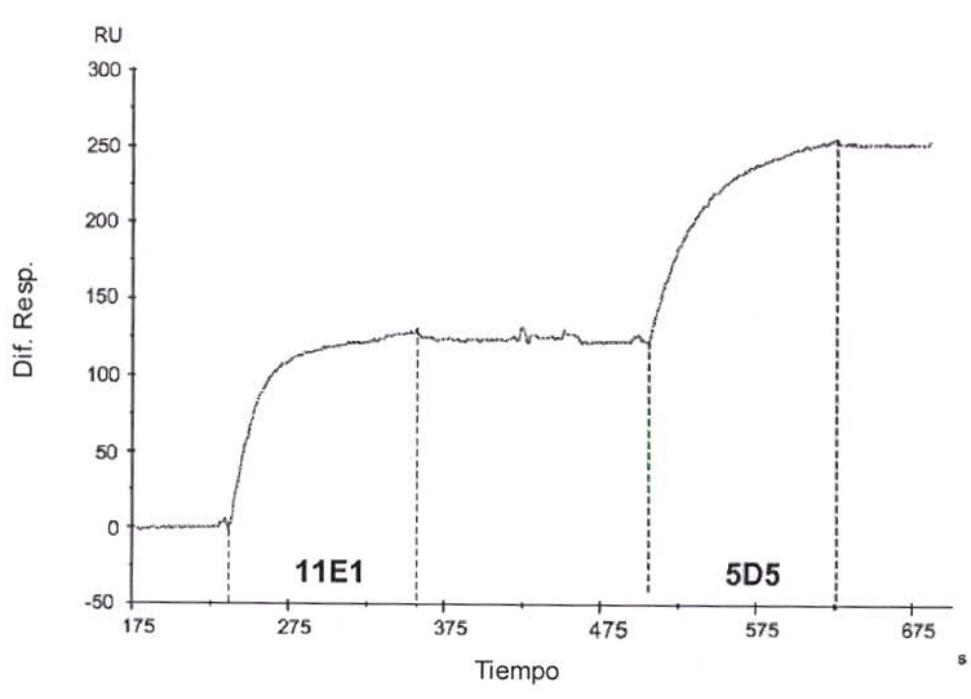


FIGURA 5B

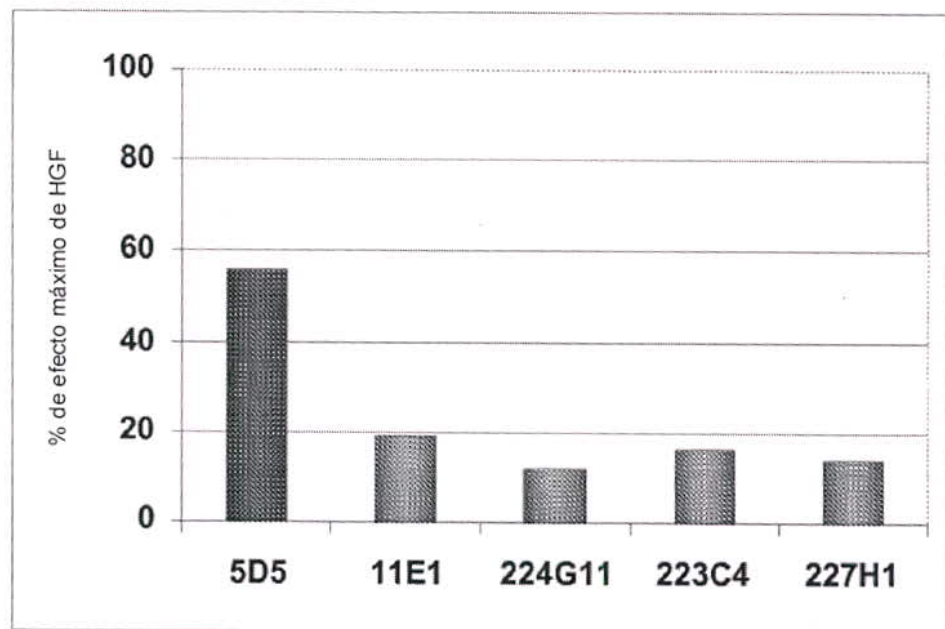


FIGURA 6A

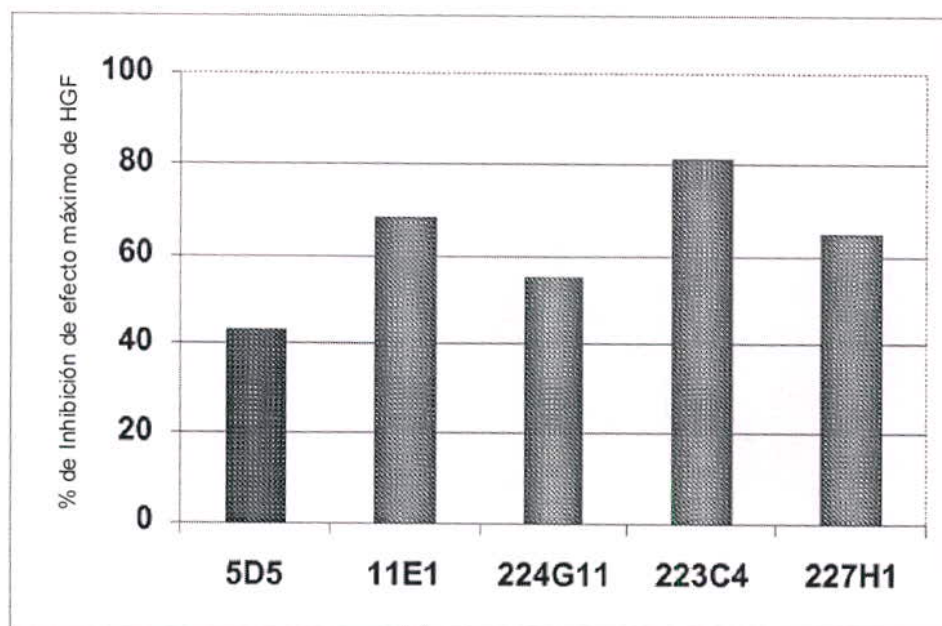


FIGURA 6B

109

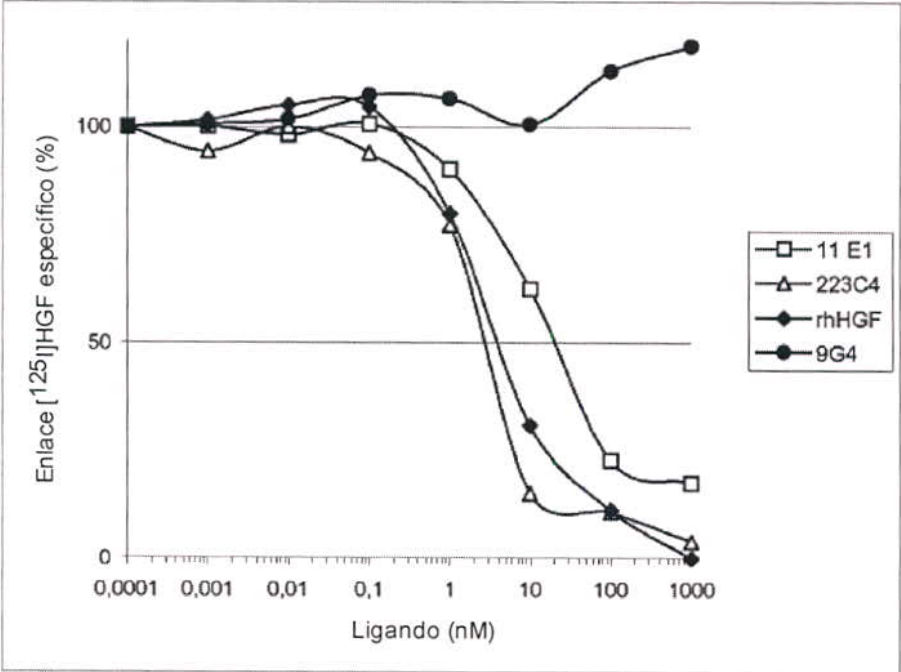


FIGURA 7A

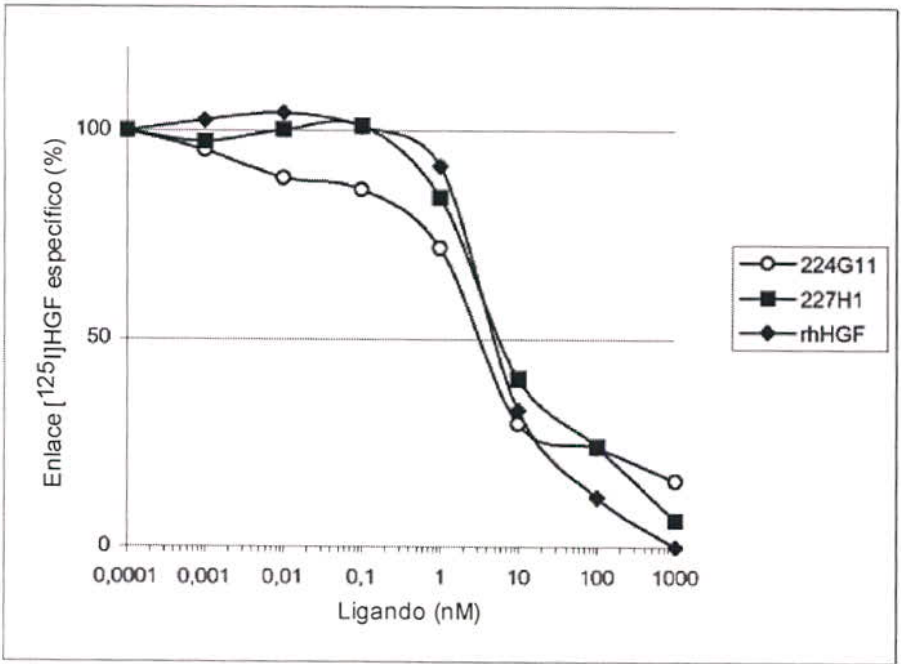


FIGURA 7B

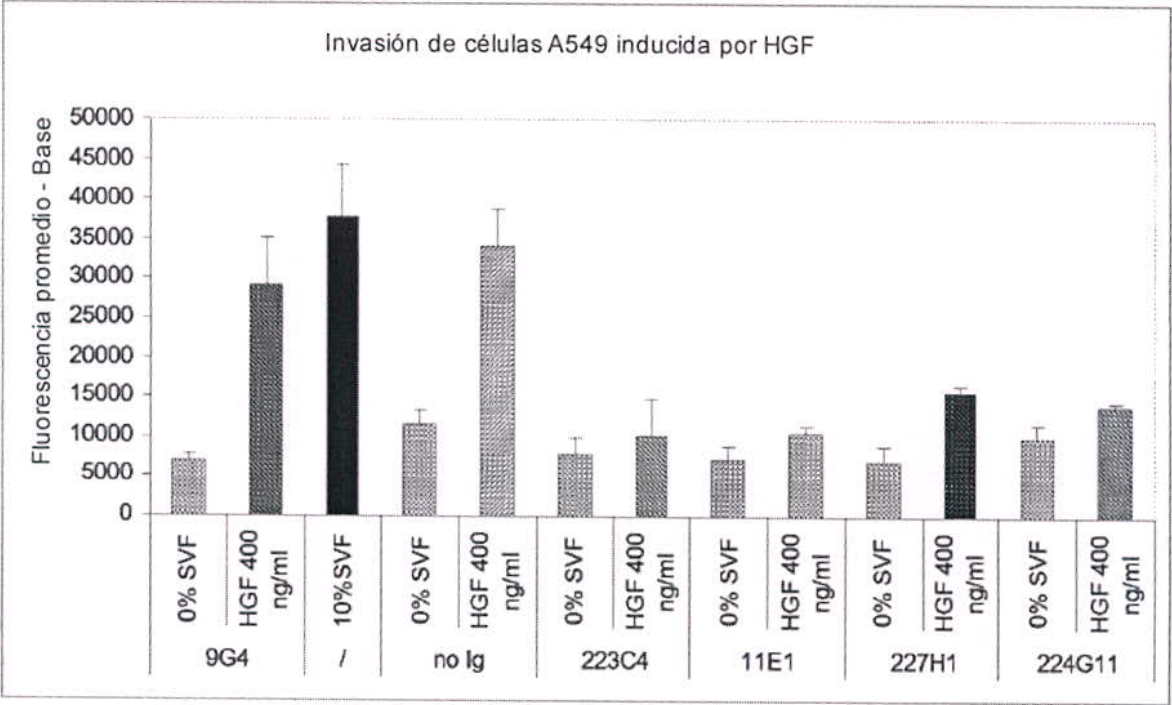


FIGURA 8

10/72

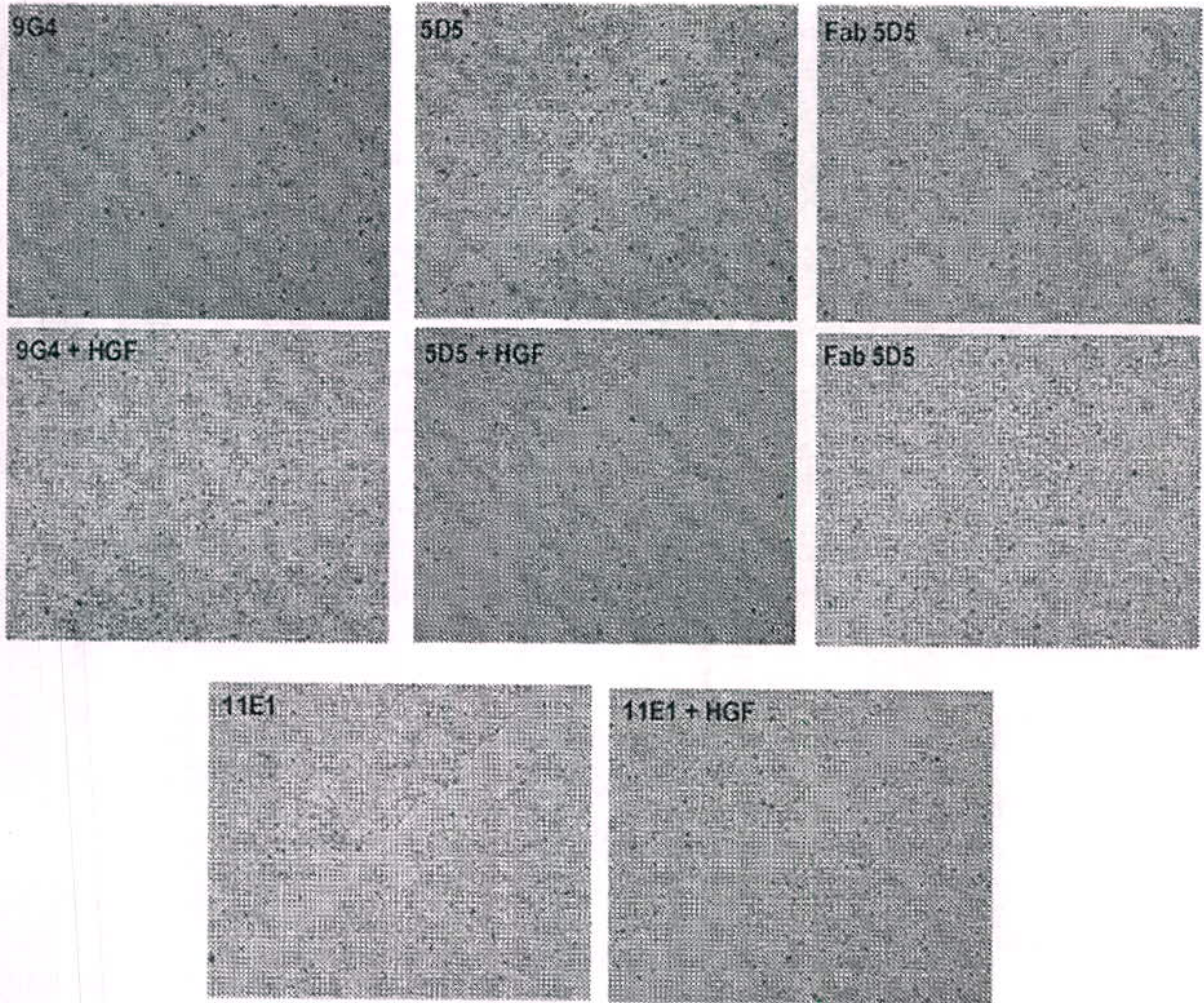


FIGURA 9

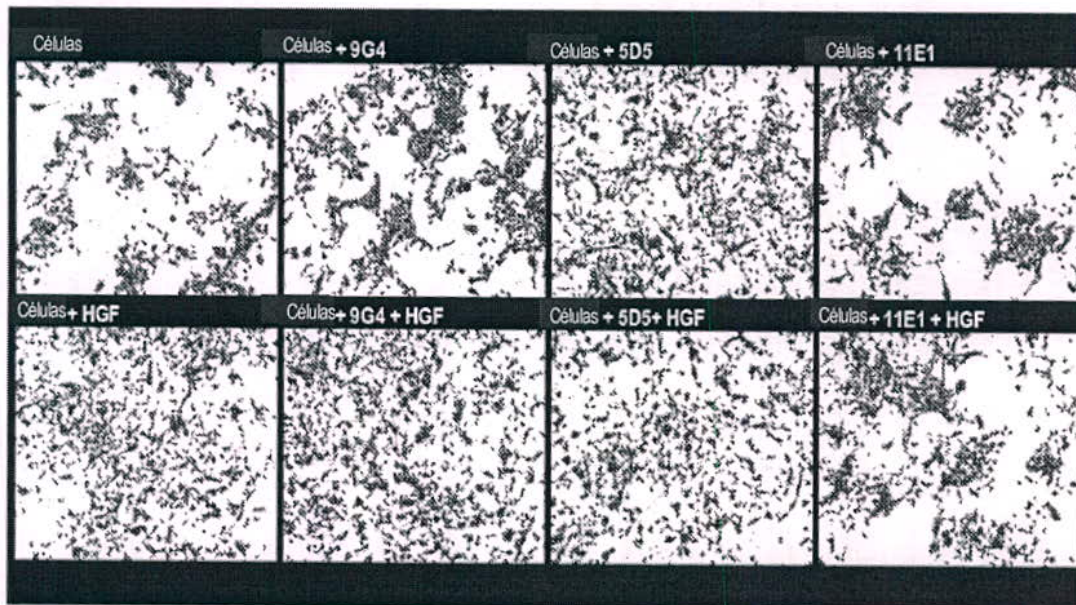


FIGURA 10A

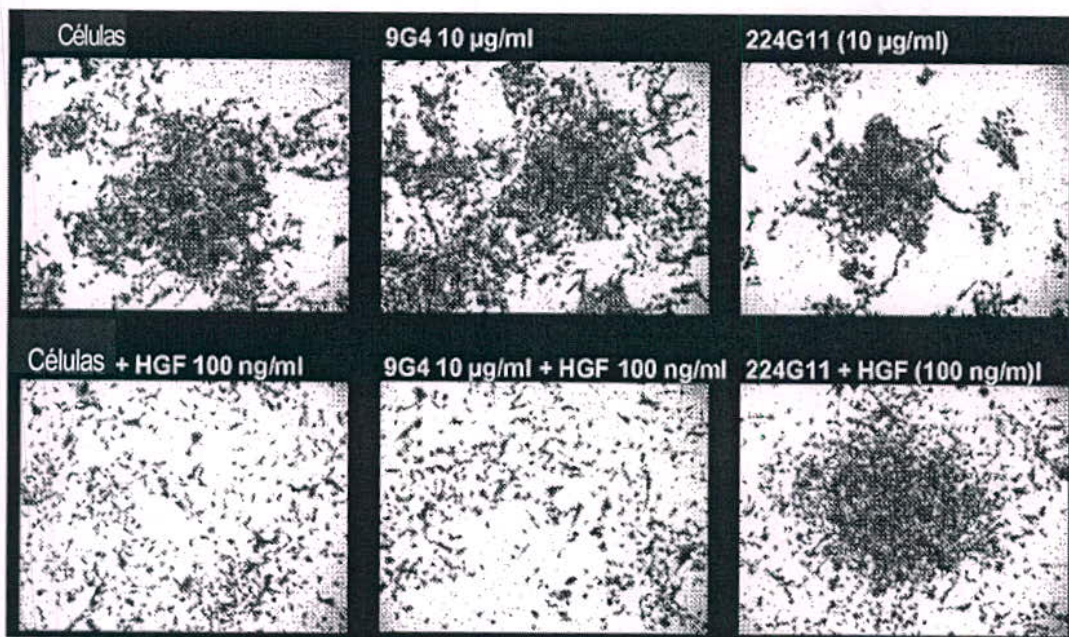


FIGURA 10B

12/72

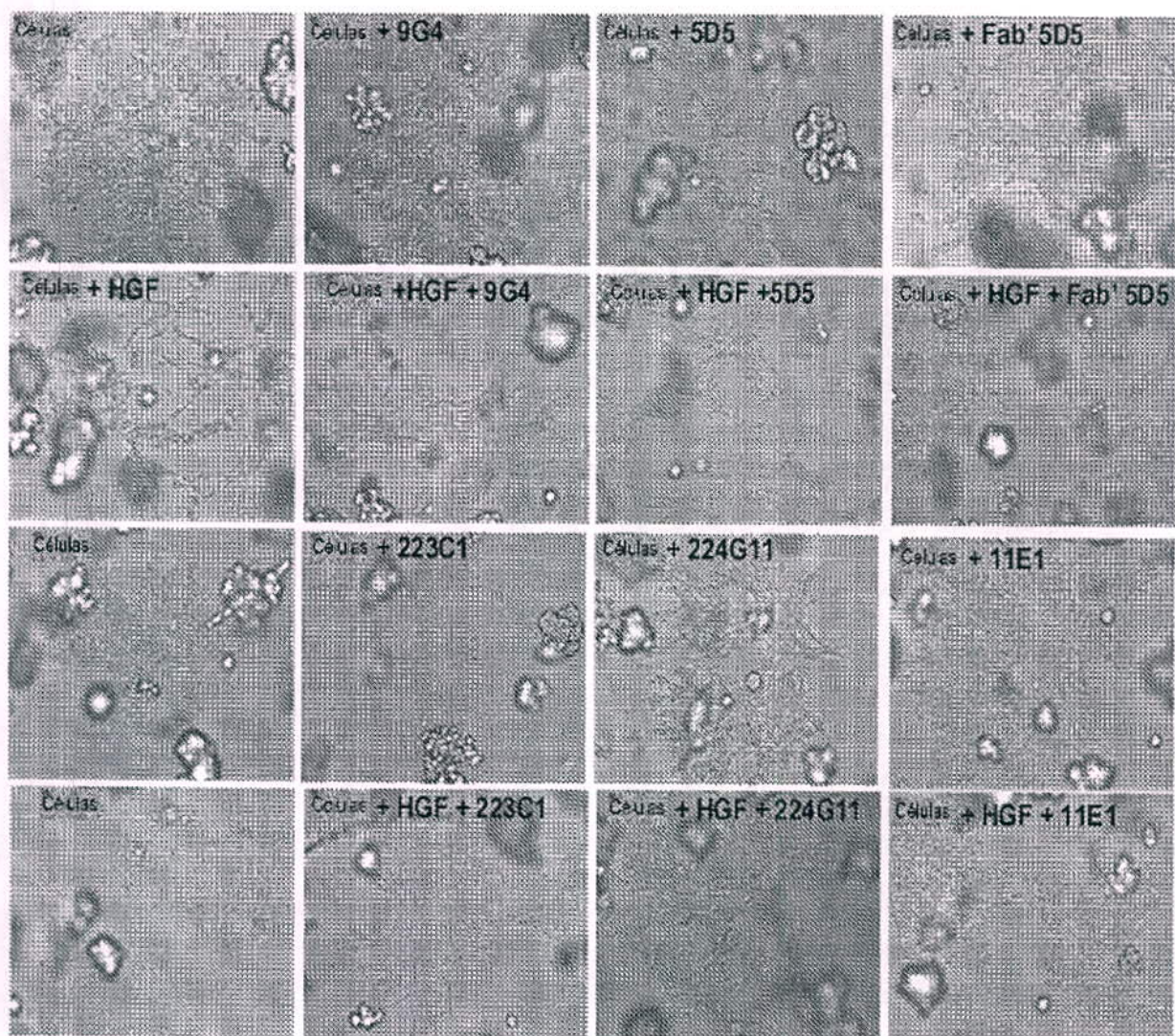


FIGURA 11

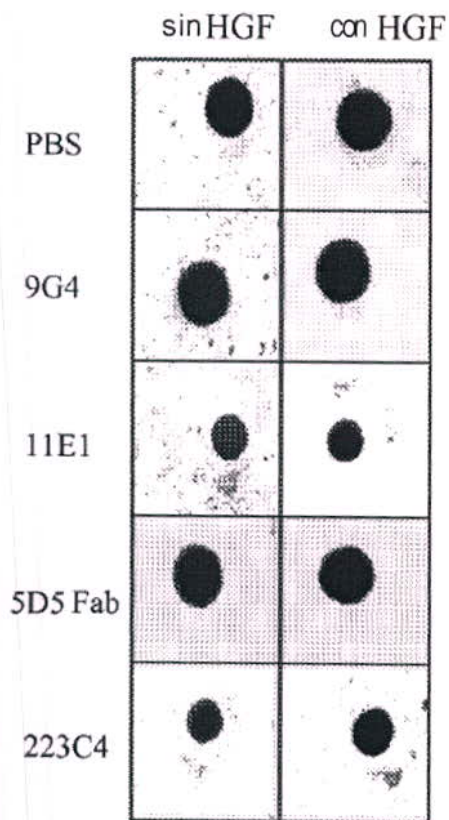


FIGURA 12A

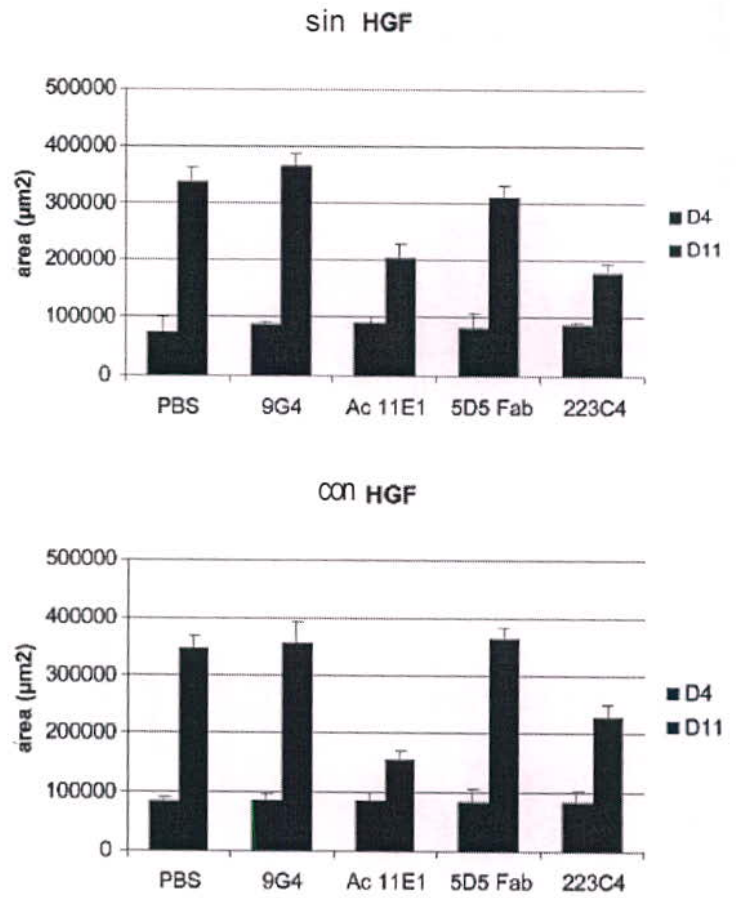


FIGURA 12B

14/72

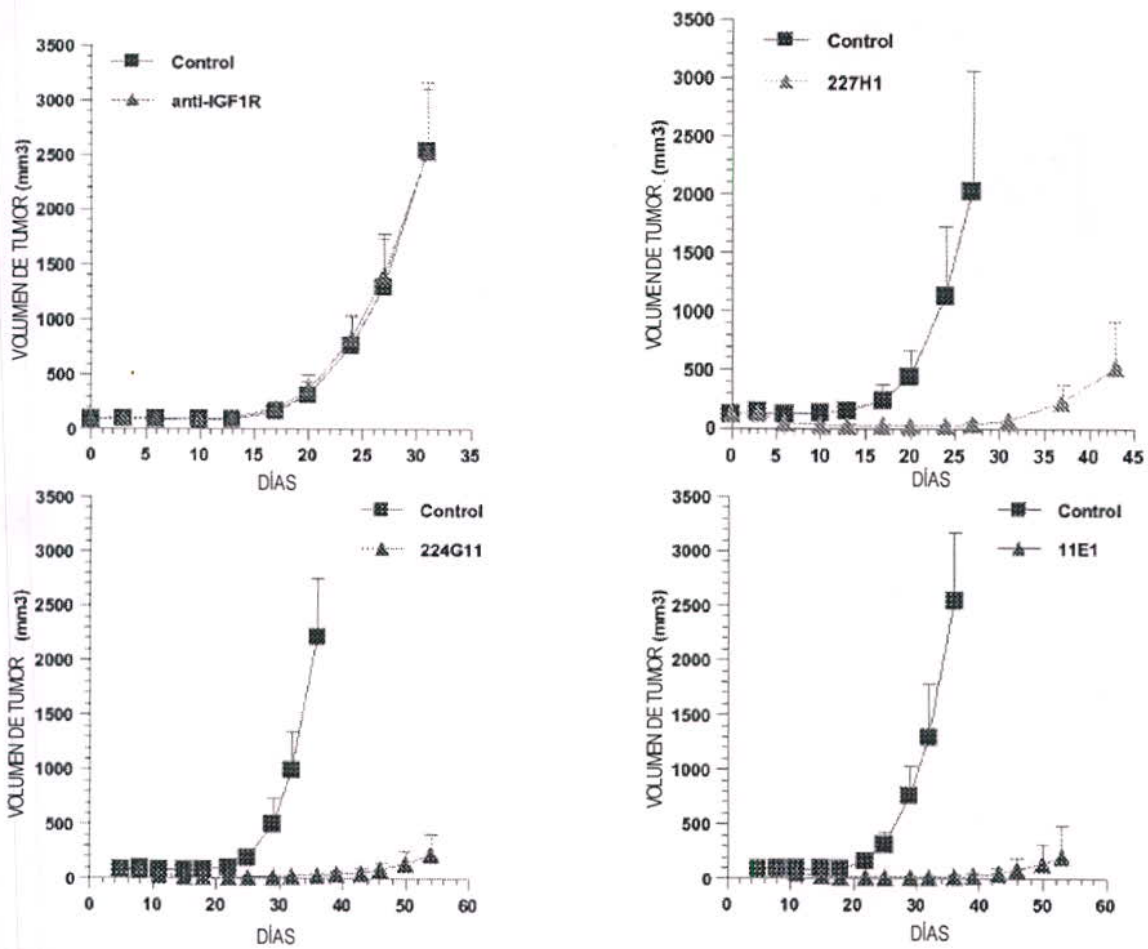


FIGURA 13

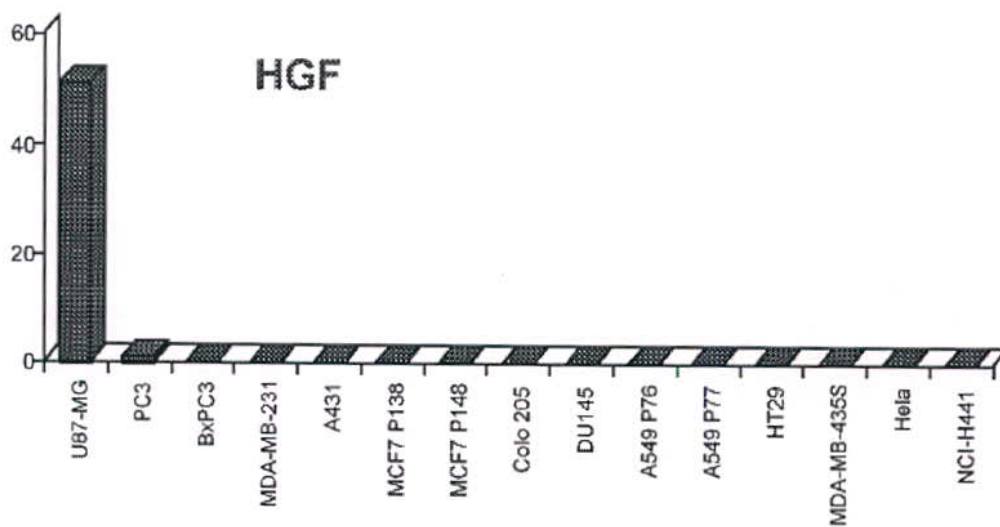


FIGURA 14

15/72

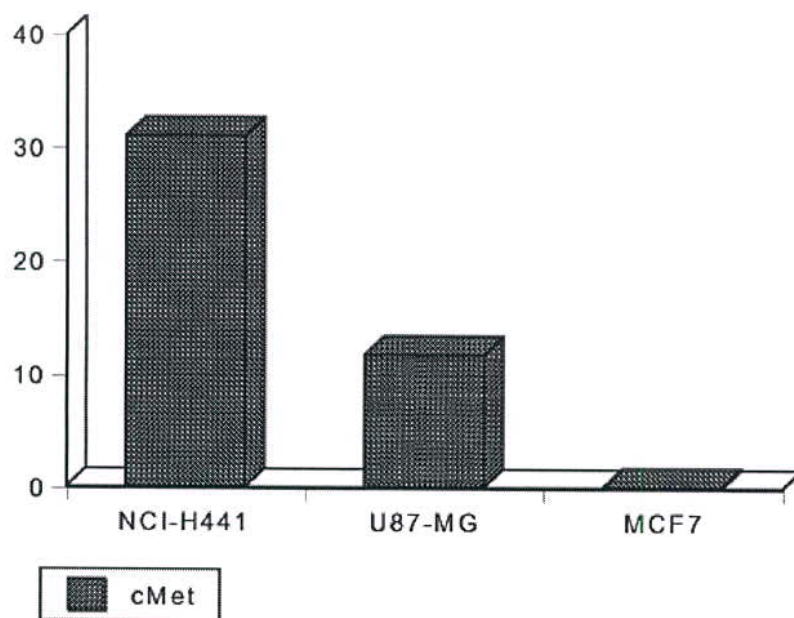


FIGURA 15A

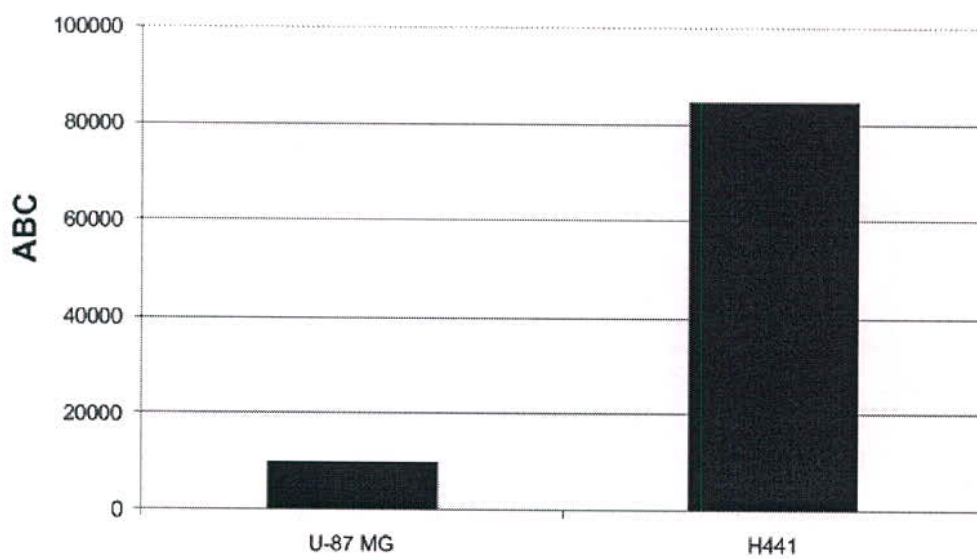


FIGURA 15B

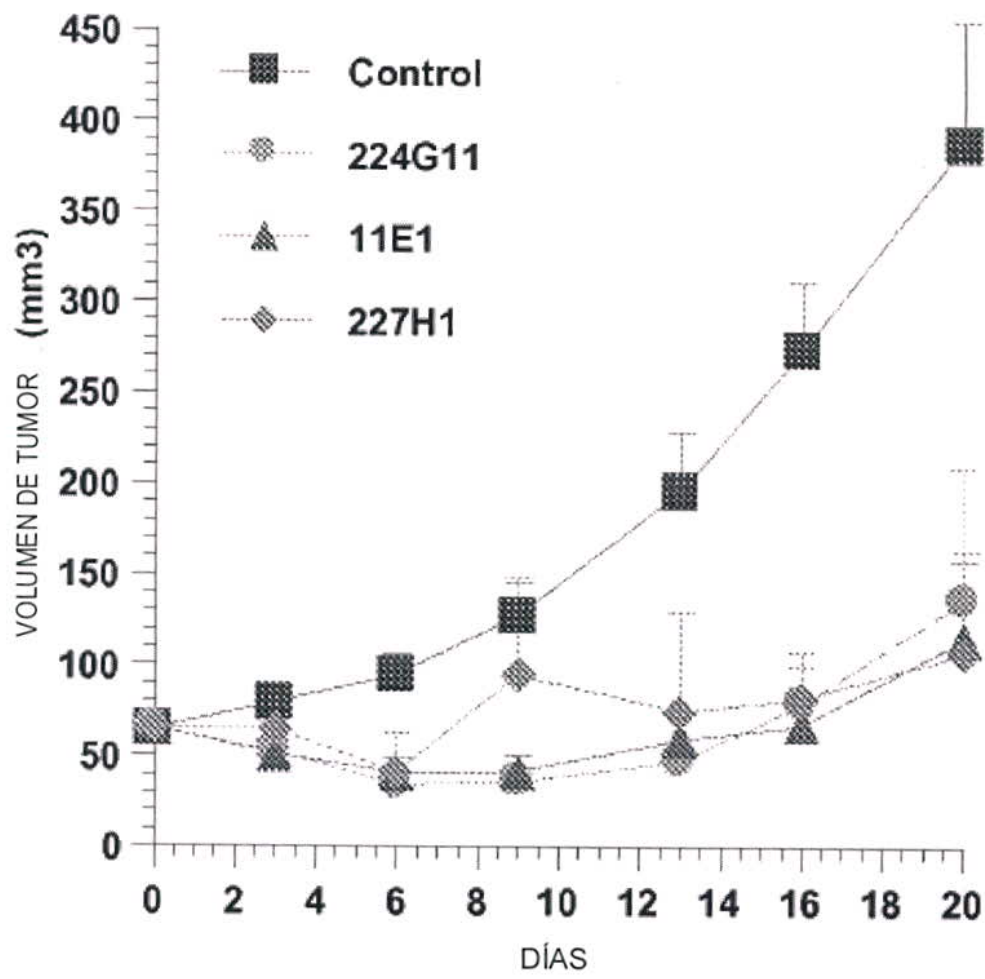


FIGURA 16

FIGURA 17A

224G11 VL
V00777 IGKJ4*01

224G11 VL
V00777 IGKJ4*01

CDR3 - IMGT
110
Q S K E D P L T F G S G T K L
caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tgg ggg aca aaa ttg

<----- FR4 - IMGT
115 120
-----g-----

----->
123
E M K
gaa atg aaa
I
--- --a --- c

FIGURA 17B

FIGURA 18A

121

20/72

224G11 VL

AF103571 IGKJ4*02

224G11 VL

AF103571 IGKJ4*02

```

      CDR3 - IMGT      <----- FR4 - IMGT -----
      110      115      120
Q   S   K   E   D   P   L   T   F   G   S   G   T   K   L
caa agt aag gag gat cct ctc acg ttc ggc tcg ggg aca aaa ttg
                                     G   V
                                     --- gga --- --c --g g--

----->
      123
E   M   K
gaa atg aaa
      I
--g --c --- c
```

FIGURA 18B

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20		30		40	50	60	
224G11 VL										
	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP	PKLLIY	RAS.....					
FR Humano	3	3 33 2 3 3					11	2 3		
224G11 HZ1VL	E-----T-SL-P-E---L-----		LA-----A-R---							
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQAPRLLIY	RAS.....						

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)		FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100	110		120	
224G11 VL								
rango	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC	QQSKEDPLT	FGSGTKLEMK					
FR Humano	223	1	323 33 2 3				3 3 3	
224G11 HZ1VL	-RAT---.-----.-G-----SSL-PE-F-V---		--G---V-I-					
	NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISSELPEDFAVYYC	QQSKEDPLT	FGGGTKVEIK					

FIGURE 19A

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20		30		40	50	60	
224G11 VL										
	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP	PKLLIY	RAS.....					
FR Humano	1 3	3 3 32					11			
224G11 HZ2VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	ESVDSYANSF..	LAWYQQKPGQP	PKLLIY						
	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQP	PKLLIY	RAS.....					

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)		FR4-IMGT (114-123)	
	70	80	90	100	110		120	
224G11 VL								
	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC	QQSKEDPLT	FGSGTKLEMK					
FR Humano	22 3 3	1	3233 3 3				3 3 3	
224G11 HZ2VL	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC		FGGGTKVEIK					
	TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC	QQSKEDPLT	FGGGTKVEIK					

FIGURA 19B

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

<----- FR1 - IMGT
1 5 10 15
E V Q L Q Q S G P E L V K P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga oct ... gag ctg gtg aag oct

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

<----->
20 25 30
G A S V K I S C K T S G Y I F
ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag act tot gga tac ata ttc
P A T
----- c- - - - - g- - - - - c- - - - -

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

CDR1 - IMGT <----->
35 40 45
T A Y T M H W V R Q S
act gca tac acc atg cac tgg gtg agg cag agc
D N D K
--- -ac - - - -a- -g- - - - -a- - - - -

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

FR2 - IMGT <-----> CDR2
50 55 60
L G E S L D W I G G I K P N N
ctt gga gag agc ctt gac tgg att gga ggt att aaa cca aac aat
H K E D N
-a- - - - a- - - - -g- - - - -a- - - - -t- - - - -

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

- IMGT <----->
65 70 75
G L A N Y N Q K F K G K
ggt ctt gct aac tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
G T I
--- gg- a- - - - -t- - - - - - - - - - - - - - -

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

<----- FR3 - IMGT <----->
80 85 90
A T L T V D K S S S T A Y M D
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gac
E
----- -g- - - - -

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

<----->
95 100 105
L R S L T S E D S A V Y Y C A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gat tct gca gtc tat tac tgt gca
T
--- - - - -c a- - - - - - - - - - - - - - -

224G11 VH
AC090843 IGHV1-18*01

CDR3 - IMGT <----->
110 115 120
R S E I T T E F D Y W G Q G T
aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc

224G11 VH

FR4 - IMGT <----->
126
A L T V S S
gct ctc aca gtc tcc tca

FIGURA 20A

224G11 VH
J00431 IGHD2-4*01

CDR3 - IMGT
105 110 115
A R S E I T T E F D Y
gca aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac
a-- at- --- --- --

FIGURA 20B

224G11 VH
V00770 IGHJ2*01

CDR3 - IMGT
110 115 120
R S E I T T E F D Y W G Q G T
aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc cea ggc acc
Y
... .. .ac t-c --- --- --- --- ---
FR4 - IMGT ----->
126
A L T V S S
gct ctg aca gtc tcc tca
T
a-- --- --- --- --- g

224G11 VH
V00770 IGHJ2*01

FIGURA 20C

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
E V Q L Q Q S G P E L V K P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gag ctg gtg aag cct
Q      V      A      V K
c-- --g --- -- gtg --- --g g-- ... --g aa- --- --

----->
20      25      30
G A S V K I S C K T S G Y I F
ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag act tct gga tac ata ttc
V      A      T
--- --c --- -- g-c --- -- g-- --- -- --cc ---

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T A Y T M H W V R Q S
act gca tac acc ... .. atg cac tgg gtg agg cag agc
G      Y      A
--c -gc --- tat ... .. --- --- c-a --- gc-

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
L G E S L D W I G G I K P N N
ctt gga gag agc ctt gac tgg att gga ggt att aaa cca aac aat
P      Q G E M W N S
-c- --- c-a g-g --- --g --- --g --- t-g --c --c --t --- -g-

- IMGT ----->
65      70      75
G L A N Y N Q K F K G K
ggt ctt gct ... .. aac tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
G T A Q R
--- ggc a-a ... --- --t gca --- --- --t c-- ... --- -g-

----- FR3 - IMGT -----
80      85      90
A T L T V D K S S S T A Y M D
gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc aca gcc tac atg gac
V      M R T I E
-t- --c a-- --c agg --- -c- --- at- --- --- --g

----->
95      100      105
L R S L T S E D S A V Y Y C A
ctc cgc agc ctg aca tct gag gat tct gca gtc tat tac tgt gca
S R R D T
--g a-- --g --- -g- --- --c --c a-g --c --g --- --- --g

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT
110      115      120
R S E I T T E F D Y W G Q G T
aga tct gag att acg acg gaa ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc
--- ga

----->
126
A L T V S S
gct ctc aca gtc tcc tca

```

FIGURA 21A

224611 VH

J00256 IGHJ4*01

224G11 VH

J00256 IGHJ4*01

FIGURA 21B

126
127

		FR1-IMGT (1-26)					CDR1-IMGT (27-38)					FR2-IMGT (39-55)					CDR2-IMGT (56-65)														
		1		10		20		30		40		50		60																	
																															
224G11	VH	EVQLQSSGP.ELVKPGASVKISCKTS										GYIFTAYT....					MHWVRQSLGESLDWIGG					IKPNNGLA..									
rango		3	3	3	33		3	2					33	22	1	2	1														
FR Humano		Q---V---A.-VK-----V---A-										-----AP-QG-E-M-W																			
224G11	HZVH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSKAS										GYIFTAYT....					MHWVRQAPGQGLDWMGG					IKPNNGLA..									
		FR3-IMGT (66-104)										CDR3-IMGT (105-115)										FR4-IMGT (116-126)									
		70		80		90		100		110		120																			
																															
224G11	VH	NYNOKFK.GKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYC										ARSEITTEFDY										WGQGTALTIVSS									
rango		3	3	32	2	1	1	3		2	33	3	3	3			33														
FR Humano		--A---Q.-RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T-----										-----LV-----																			
224G11	HZVH	NYAQKFQ.GRVTMTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC										ARSEITTEFDY										WGQGTALTIVSS									

FIGURA 22

FIGURA 23A

227H1 VL
V00777 IGKJ4*01

----->
123
E M K
gaa atg aaa
I
--- --a --- c

CDR3 - IMGT
110
Q S N E D P F T F G S G T K L
caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

<----- FR4 - IMGT
115 120

FIGURA 23B

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
G I V L T Q S P A S L A V S L
ggc att gtg ttg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta
E      T      S      L      P
--aa --- --- --a --g --- --c a-c c-- t-- t-- --- -c-
D      M      D

```

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

----->
20      25      30
G Q R A T I S C R V S E S I D
gga cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gtc agt gaa agt att gat
E      L      A      Q      V      S
--g g-a --a --- --c-c --- --g -c- --- c-g --- g-- agc
E      N      K      S      Q      V

```

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

--- CDR1 - IMGT -----<-----
35      40      45
T Y G N S F I H W Y Q Q K
act tat ggc aat agt ttt ... .. ata cac tgg tac cag cag aaa
S      .      .      .      L      A
-gc --c ... .. t-- gc- --- --a --- ---
Y S S N K N Y L A

```

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P G Q P P K L L I Y R A S
cca gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc ... ..
A      R      D
--t --c --- g-t --- -gg --- --- ga- --- --- ... ..
W

```

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

- IMGT -----<-----
65      70      75
N L E S G I P A R
... .. aac cta gaa tct ggg atc cct ... gcc agg
R A T
... .. --agg -cc a-- --c --a ... --- ---
T R V D

```

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

----- FR3 - IMGT -----
80      85      90
F S G S G S R T D F T L T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct agg aca gac ttc acc ctc acc
G
--- --- --- ... .. g-- --- --- -t --- ---
G

```

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

----->
95      100      105
I N P V E A D D S A T Y Y C Q
att aat cct gtg gag gct gat gat tct gca acc tat tac tgt cag
S S L P E F V
--c -gc agc c-a --- c-- --a --- -t- --- gtt --- ---
S S L Q E V V

```

227H1 VL

X01668 IGKV3-11*01
Z00023 IGKV4-1*01

```

--- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
110      115      120
Q S N E D P F T F G S G T K L
caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg
R S N W
--g c-- -gc a-c tgg --t cc

```

227H1 VL

```

----->
123
E M K
gaa atg aaa

```

FIGURA 24A

227H1 VL
AF103571 IGKJ4*02

227H1 VL
AF103571 IGKJ4*02

CDR3 - IMGT
110

FR4 - IMGT
115 120

Q S N E D P F T F G S G T K L

caa agt aat gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

L G V

g c-- --- --- --- gga --- ---c --- g--

----->

123

E M K

gaa atg aaa

I

--g --c --- c

FIGURA 24B

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1102030405060			
227H1 VL				
	GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS	ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQPPKLLIY	RAS.....
	3332332		1123	
FR Humano	E-----T-SL-P-E---L---A-		LA-----A-R----	
227H1 HZ1VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQAPRLLIY	RAS.....

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)
	708090100	110	120
227H1 VL			
	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC	QQSNEDPFT	FGSGTKLEMK
	2231323323		333
FR Humano	-RAT---,-----,.-G-----SSL-PE-F-V---		--G---V-I-
227H1 HZ1VL	NRATGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTISSELPEDFAVYYC	QQSNEDPFT	FGGGTKVEIK

FIGURA 25 A

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1102030405060			
227H1 VL				
	GIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRVS	ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQPPKLLIY	RAS.....
	3133332		11	
FR Humano	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS		LAWYQQKPGQPPKLLIY	
227H1 HZ2VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	ESIDTYGNSF..	IHWYQQKPGQPPKLLIY	RAS.....

	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)
	708090100	110	120
227H1 VL			
	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDSATYYC	QQSNEDPFT	FGSGTKLEMK
	22331323333		333
FR Humano	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISLQAEDVAVYYC		FGGGTKVEIK
227H1 HZ2VL	TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC	QQSNEDPFT	FGGGTKVEIK

FIGURA 25 B

137

```

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
E V Q L Q Q S G P E L V K P
gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gaa ctg gtg aag cct
--- --g ---

----->
20      25      30
G A S M K I S C K A S G Y S F
gga gct tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tat tca ttc
V P T
--g --- g-- --a c-- --- --a --c a--

CDR1 - IMGT <-----
35      40      45
T D Y T L N W V K Q S
act gac tac acc ... ctg aac tgg gtg aag cag agc
N M D
--- --a- ... a-- g--

FR2 - IMGT -----> CDR:
50      55      60
H G K T L E W I G L I N P Y N
cat gga aag acc ctt gag tgg att gga ctt att aat cct tac aat
S D N
--- --g- --- ga- --- a--

- IMGT <-----
65      70      75
G G T T Y N Q K F K G K
ggt ggt act ... acc tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
I
--- ... -t- ...

----- FR3 - IMGT -----
80      85      90
A T L T V D K S S S T A Y M E
gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg gag
--- --g- --- --c- ---

----->
95      100      105
L L S L T S E D S A V Y Y C A
ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
R T
--- -g- --c- --- a--

CDR3 - IMGT <-----
110      115      120
R E E I T K D F D F W G Q G T
aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
---

FR4 - IMGT ----->
126
T L T V S S
act ctc aca gtc tcc tca

```

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH
AC090843 IGHV1-18*01

227H1 VH

FIGURA 26 A

227H1 VH
IGHD1-1*02

CDR3 - IMGT
105 110 115
A R E E I T K D F D F
gca aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc
-t- -t- gc- --

FIGURA 26 B

227H1 VH
V00770 IGHJ2*01

CDR3 - IMGT
110 115 120
R E E I T K D F D F W G Q G T
aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
Y Y
... .. -c t-- --c -a- --- --- --- ---
FR4 - IMGT ----->
126
T L T V S S
act ctc aca gtc tcc tca
--- --- --- --- --- g

227H1 VH
V00770 IGHJ2*01

FIGURA 26 C

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

<----- FR1 - IMGT ----->
 1 5 10 15
 E V Q L Q Q S G P E L V K P
 gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct ... gaa ctg gtg aag cct
 Q V A V K
 c-- --g --- --g g-- ... --g g-- aa- --- --

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

----->
 20 25 30
 G A S M K I S C K A S G Y S F
 gga gct tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tat tca ttc
 V V T
 --g --c --- g-- --g-c --- --a --c a-c ---

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

CDR1 - IMGT <----->
 35 40 45
 T D Y T L N W V K Q S
 act gac tac acc ... ctg aac tgg gtg aag cag agc
 G Y M H R A
 --c -g- --- tat ... a-- c-- --- cga --- gc-

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

FR2 - IMGT -----> CDR2
 50 55 60
 H G K T L E W I G L I N P Y N
 cat gga aag acc ctt gag tgg att gga ctt att aat cct tac aat
 P Q G M W N
 -c- --- c-a ggg --- --g --- tgg --c --c --- a-- -g-

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

- IMGT <----->
 65 70 75
 G G T T Y N Q K F K G K
 ggt ggt act ... acc tac aac cag aag ttc aag ... ggc aag
 N A Q R
 --- --c --a ... -a- --t gca --- --t c-- ... --g-

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

----- FR3 - IMGT ----->
 80 85 90
 A T L T V D K S S S T A Y M E
 gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg gag
 V M R T I
 -t- --c a-g --c agg --- -c- --c at- --- --- ---

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

----->
 95 100 105
 L L S L T S E D S A V Y Y C A
 ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
 S R R D T
 --g ag- --g --- -g- --- --c --- a-g --c --g --- --- --g

227H1 VH

X62106 IGHV1-2*02

CDR3 - IMGT <----->
 110 115 120
 R E E I T K D F D F W G Q G T
 aga gag gaa att acg aag gac ttt gat ttc tgg ggc caa ggc acc
 --- --

227H1 VH

FR4 - IMGT ----->
 126
 T L T V S S
 act ctc aca gtc tcc tca

FIGURA 27 A

227H1 VH

J00256 IGHJ4*01

227H1 VH

J00256 IGHJ4*01

FIGURA 27B

227H1 VH

rango

FR Humano

227H1 HZVH

227H1 VH

rango

FR Humano

227H1 HZVH

FIGURA 28

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

<----- FR1 - IMGT
 1 5 10 15
 D I Q M T Q S P A S L S V S V
 gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gta tct gtg

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

----->
 20 25 30
 G E T V T I T C R A S E N I Y
 gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

--- CDR1 - IMGT <-----
 35 40 45
 S N L A W Y Q Q K
 agt aat tta gca tgg tat cag cag aaa

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

FR2 - IMGT -----> CDR2
 50 55 60
 Q G K S P Q L L V Y A A T
 cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat gct gca aca

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

- IMGT <-----
 65 70 75
 N L V D G V P S R
 aac tta gta gat ggt gtg cca ... tca agg
 A
 -c-

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

----- FR3 - IMGT -----
 80 85 90
 F S G S G S G T Q Y S L K
 ttc agt ggc agt gga tca ggc aca cag tat tcc ctc aag

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

----->
 95 100 105
 I N S L Q S E D F G S Y Y C Q
 atc aac agc ctg cag tct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa

VL 223C4

AJ235956 IGKV12-46*01

--- CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->
 110 115 120 123
 H F W G P P Y T F G G G T K L
 cat ttt tgg ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg
 T
 --- -- a-- --t cc

FIGURA 29A

VL 223C4

V00777 IGKJ2*01

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->
 110 115 120 123
 G P P Y T F G G G T K L E I K
 ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ata aag
 --- --a --- --a

FIGURA 29B

138

```

<----- FR1 - IMGT -----
1      5      10      15
D I Q M T Q S P A S L S V S V
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gta tct gtg
      S      A
-----
VL 223C4
Y14865 IGKV1-NL1*01
----->
      20      25      30
G E T V T I T C R A S E N I Y
gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac
      D R      Q G S
-----
VL 223C4
Y14865 IGKV1-NL1*01
----->
CDR1 - IMGT <-----
      35      40      45
S N      L A W Y Q Q K
agt aat ... .. tta gca tgg tat cag cag aaa
N S
-a- tc- ... .. -c-
-----
FR2 - IMGT -----> CDR2
      50      55      60
Q G K S P Q L L V Y A A T
cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat gct gca aca ... ..
P A K L S
-ca --g --- g-c --- a-- --- c-- --- t-c ... ..
-----
- IMGT ----->
      65      70      75
      N L V D G V P S R
... .. aac tta gta gat ggt gtg cca ... tca agg
      R E S
... .. -ga --g -a- ag- --g --c --- --c ---
-----
FR3 - IMGT ----->
      80      85      90
F S G S G      S G T Q Y S L K
ttc agt gcc agt gga ... .. tca gcc aca cag tat tcc ctc aag
      D T T
-----
VL 223C4
Y14865 IGKV1-NL1*01
----->
      95      100      104
I N S L Q S E D F G S Y Y C Q
atc aac agc ctg cag tct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa
      S P A T
-----
VL 223C4
Y14865 IGKV1-NL1*01
----->
CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT -----
      110      115      120      123
H F W G P P Y T F G G G T K L
cat ttt tgg ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg
Q Y Y S T
--g -a- -at a-- a-c --t cc

```

FIGURA 30A

```

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT -----
      110      115      120      123
G P P Y T F G G T K L E I K
ggt cct ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gag ata aag
      Q
-----
J00242 IGKJ2*01
----->
      - --- --t --t --c ca- --- --- --- --- --c ---a

```

FIGURA 30B

Hz VL 223C4	<-----FR1 - IMGT----->
	1 5 10 15
	D I Q M T Q S P S S L S A S V
Hz VL 223C4	----->
	20 25 30
	G D R V T I T C R A S E N I Y
Hz VL 223C4	-----<-----CDR1 - IMGT----->
	35 40 45
	S N L A W Y Q Q K
Hz VL 223C4	----->-----FR2 - IMGT----->
Retromutación	50 55 60
	P G K A P K L L L Y A A T
	Q S Q
	3 2 2
Hz VL 223C4	-----<-----IMGT----->
Retromutación	65 70 75
	R L E S G V P S R
	N V D
	1 1 2
Hz VL 223C4	-----<-----FR3 - IMGT----->
Retromutación	80 85 90
	F S G S G S G T D Y T L T
	Q
	2
Hz VL 223C4	----->-----
Retromutación	95 100 105
	I S S L Q P E D F A T Y Y C Q
	N S
	2 3
Hz VL 223C4	-----<-----CDR3 - IMGT----->-----<-----FR4 - IMGT----->
	110 115 120
	H F W G P P Y T F G Q G T K L
Hz VL 223C4	----->
	123
	E I K

FIGURA 31

AC090843 IGHV1-18*01

D13199 IGHD6-3*01

FIGURA 32B

FIGURA 32C

FIGURA 33A

FIGURA 33B

FIGURA 33C

Hz VH 223C4
Retromutación

```

<----- FR1 - IMGT ----->
1      5      10      15
Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P
E      L  Q      P      V
2      2      2      3      3
  
```

Hz VH 223C4
Retromutación

```

----->
      20      25      30
G  A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F
                P
                3
  
```

Hz VH 223C4
Retromutación

```

----- CDR1 - IMGT -----<-----
      35      40      45
T  D  Y  N      M  H  W  V  R  Q  A
                D  S
                1  1
  
```

Hz VH 223C4
Retromutación

```

FR2 - IMGT ----->----- CDR2
      50      55      60
P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  N  P  N  N
H      M      D
3      2      1
  
```

Hz VH 223C4
Retromutación

```

- IMGT -----<-----
      65      70      75
G  G  T      N  Y  A  Q  K  F  Q  G  R
                I  F
                1  1
  
```

Hz VH 223C4
Retromutación

```

----- FR3 - IMGT -----
      80      85      90
V  T  M  T  R  D  T  S  I  S  T  A  Y  M  E
                V
                2
  
```

Hz VH 223C4

```

----->-----
      95      100      105
L  S  R  L  R  S  D  D  T  A  V  Y  Y  C  A
  
```

Hz VH 223C4

```

----- CDR3 - IMGT -----<-----
      110      115      120
R  G  R  Y  V  G  Y  Y  Y  A  M  D  Y  W  G
  
```

Hz VH 223C4

```

----- FR4 - IMGT ----->
      125      129
Q  G  T  T  V  T  V  S  S
  
```

FIGURA 34

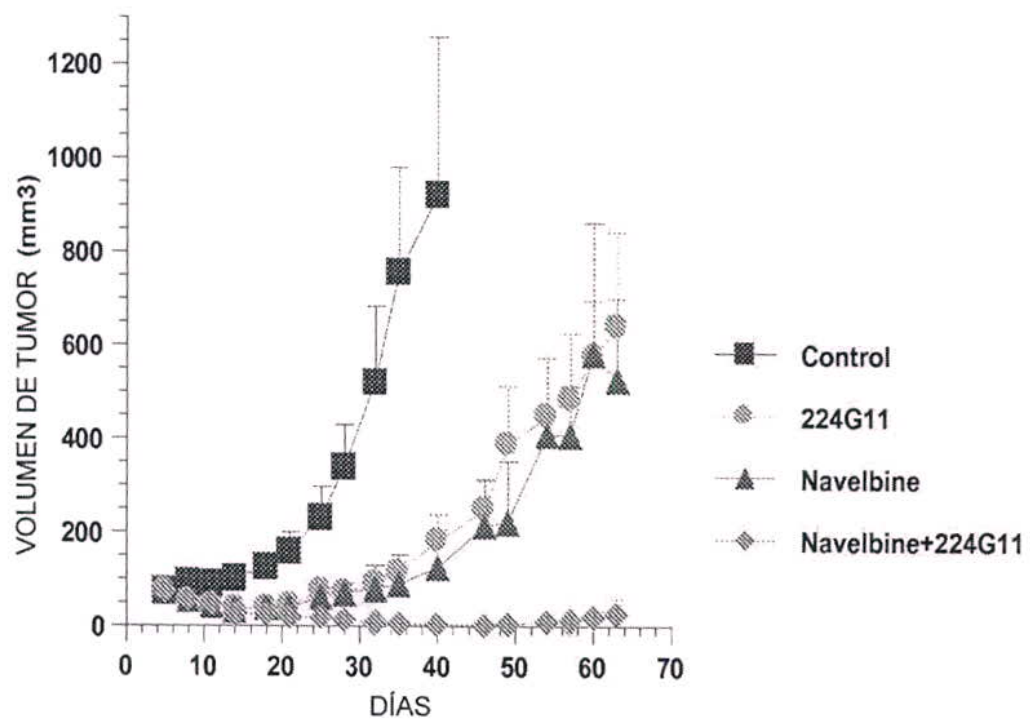


FIGURA 35



FIGURA 36

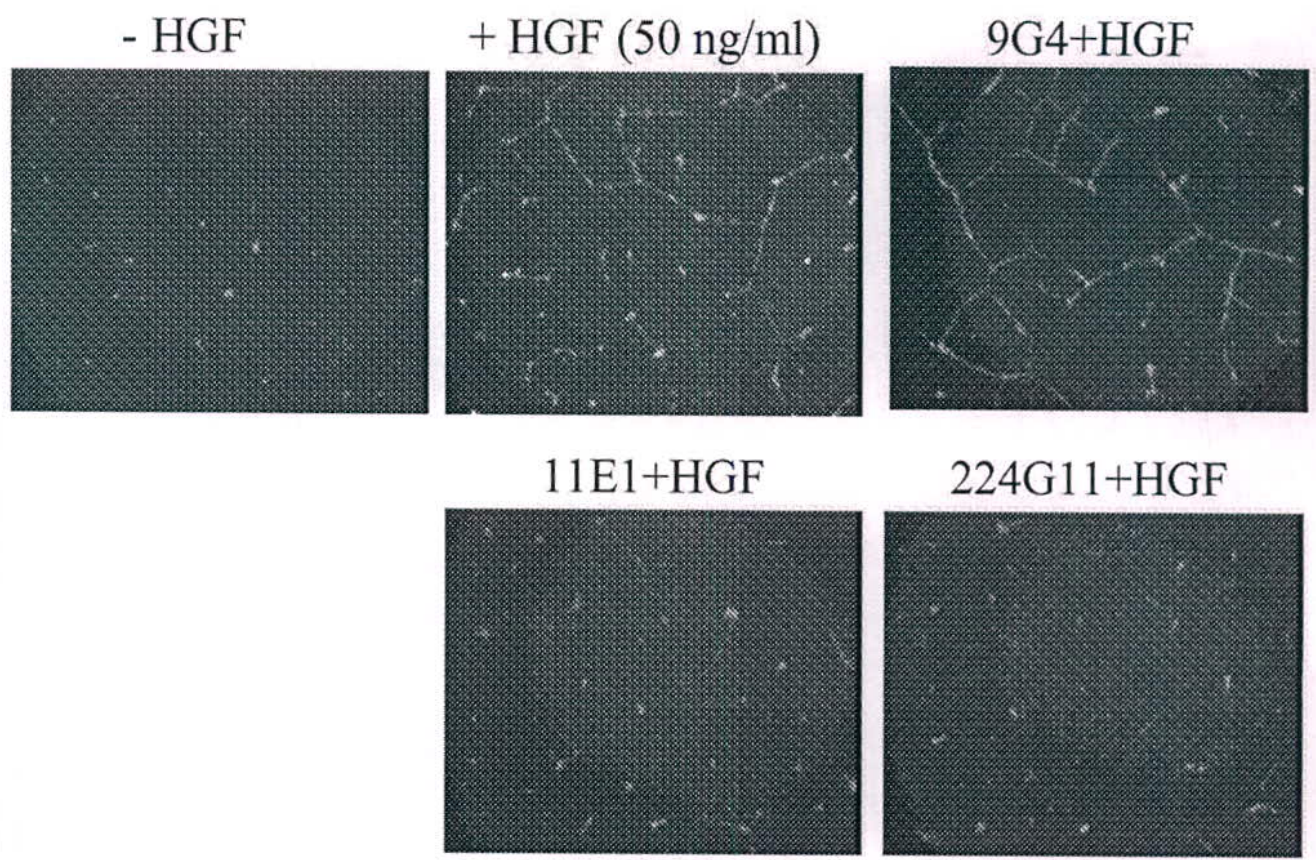


FIGURA 37

```

11E1 VL
AJ231214 IGKV4-79*01

<----- FR1 - IMGT
1      5      10      15
Q I V L T Q S P A I M S A S P
caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct

----->

20      25      30
G E K V T L T C S A S S S V S
ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt

----->

CDR1 - IMGT
35      40      45
S T Y L Y W Y Q Q K
tec acc tac ... .. ttg tac tgg tac cag cag aag
S
-g- ... ..

FR2 - IMGT -----> CDR2
50      55      60
P G S S P K L W I Y T T S
cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat acc aca tcc ... ..
S
-g- ... ..

- IMGT ----->
65      70      75
I L A S G V P A R
... .. atc ctg gct tct gga gtc cct ... gct cgc
N
... .. -a- ... ..

-----> FR3 - IMGT ----->
80      85      90
F S G S G S G T S Y S L T
ttc agt ggc agt ggg ... .. tct ggg acc tct tac tct ctc aca

----->
95      100      105
I S S M E T E D A A S Y F C H
atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
A
g- ... ..

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT
110      115      120
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg
P
cc- c

----->
123
D I K
gac ata aaa
11E1 VL

```

FIGURA 38A

11E1 VL
V00777 IGKJ4*01

----->
123
D I K
gac ata aaa
E
--a --- --- c

CDR3 - IMGT
110
Q W S S Y P F T F G S G T K L
cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg

<----- FR4 - IMGT
115 120

FIGURA 38B

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

<----- FR1 - IMGT
 1 5 10 15
 Q I V L T Q S P A I M S A S P
 caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct gca tct cct
 E M T L L
 g-- --a a-g --a --c -c- c-- --a --a

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

----->
 20 25 30
 G E K V T L T C S A S S S V S
 ggg gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt
 R A S R Q
 --- --a -ga -c- --c t-- --g --t cag --- --t --c

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

CDR1 - IMGT <-----
 35 40 45
 S T Y L Y W Y Q Q K
 tcc acc tac ttg tac tgg tac cag cag aag
 S S
 ag- -g- --- --a -c- --- --a

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

FR2 - IMGT -----> CDR2
 50 55 60
 P G S S P K L W I Y T T S
 cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg att tat acc aca tcc
 Q A R L G A
 --t --g cag g-t --g --c ctc --c --ggt g-- ---

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

- IMGT ----->
 65 70 75
 I L A S G V P A R
 atc ctg gct tct gga gtc cct ... gct cgc
 T R T I
 -c- ag- --c a-- --c a-- --a ... --c a-g

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

FR3 - IMGT ----->
 80 85 90
 F S G S G S G T S Y S L T
 ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca
 D F T
 --- --- --- --- --a gac -t- a-- --- --c

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

----->
 95 100 105
 I S S M E T E D A A S Y F C H
 atc agc agc atg gag act gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat
 L Q P F V Y Q
 --- --- --- --- tt- --a gt- --- -a- --t --g

11E1 VL

X72820 IGKV3D-7*01

CDR3 - IMGT -----> FR4 - IMGT ----->
 110 115 120
 Q W S S Y P F T F G S G T K L
 cag tgg agt agt tac cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg
 D Y N L
 --- gat ta- -ac -ta --t cc

11E1 VL

----->
 123
 D I K
 gac ata aaa

FIGURA 39A

100

11E1 VL
AF103571 IGKJ4*02

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->
110 115 120 123
Y P F T F G S G T K L D I K
tac cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gac ata aaa
G V E
.....g c-- --- --- --- gga --- -c --- g--g-c--

FIGURA 39B

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1 10 20	30	40 50	60
11E1 VL				
rango	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTLTCSAS	SSVSSTY.....	LYWYQQKPGSSPKLWIY	TTS.....
FR Humano	3 1 33 3 33 3 2		1 33 3 2	
11E1 HZVL	E--M-----TL-L---RA--S-R--		-S-----QA-R-L--	
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	SSVSSTY.....	LYWYQQKPGQAPRLLIY	TTS.....
	FR3-IMGT (66-104)		CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)
	70 80 90 100		110	120
11E1 VL				
rango	ILASGVP.ARFSGSG..SGTSYSLTISSMETEDAASYFC		HQWSSYPFT	FGSGTKLDIK
FR Humano	22 3 3 213 321 2 3 3			3 32
11E1 HZVL	TR-T-I-.-----DFT-----LQP--F-V-Y-			--G---VE--
	TRATGIP.ARFSGSG..SGTDYTLTISSLQTEDEFAVYYC		HQWSSYPFT	FGGGTKVEIK

FIGURA 40

FIGURA 41A

152

51/72

11E1 VH
L32868 IGHD4-1*01

CDR3 - IMGT
105 110 115
A I G G Y G S W F A Y
gca ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac
-g --- c

FIGURA 41B

11E1 VH
V00770 IGJ3*01

CDR3 - IMGT
110 115 120
I G G Y G S W F A Y W G Q G T
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act
..
FR4 - IMGT ----->
126
L V T V S A
ctg gtc act gtc tct gca
--- --- --- --- --- g

11E1 VH
V00770 IGJ3*01

FIGURA 41C

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

<----- FR1 - IMGT -----
1      5      10      15
Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  A      E  L  A  K  P
cag gtc cag ctt cag cag tct ggg gct ... gaa ctg gca aaa cct
      V      V      K
--- --g --- --g gt- --- --- --- --- --g g-- aag --g ---
      V      V      K

```

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

----->
      20      25      30
G  A  S  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F
ggg gcc tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttt
      V      g-c --- --- --- --a --- --c ---
      V

```

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

--- CDR1 - IMGT -----<-----
      35      40      45
T  S  Y  W      M  N  W  V  K  Q  R
act tcc tac tgg ... .. atg aac tgg gtg aaa cag agg
      G      Y      H      R      A
--c gg- --- -at ... .. --- c- --- --- cg- --- gcc
      Y      H      R      A

```

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

FR2 - IMGT -----> CDR2
      50      55      60
P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y  I  N  P  T  T
cct gga cag ggt ctg gaa tgg att gga tac att aac cct acc act
      M      W      N      S
--- --- --a --g --t --g --- --g --- --c --- --a- --g-
      M      I      S      G

```

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

- IMGT -----<-----
      65      70      75
G  S  T      D  Y  N  Q  K  L  K      D  K
ggt tct act ... .. gac tac aat cag aag tta aag ... gac aag
      G      N      A      F  Q      G  R
--- ggc --a ... .. a-- --t gca --- --t c-- --- --g- --g-
      ... .. S      A      F  Q      G  R

```

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

----- FR3 - IMGT -----
      80      85      90
A  T  L  T  A  D  K  S  S  N  T  A  Y  M  Q
gcc aca ttg act gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac atg caa
V      M      R      T      I  S      E
-t- --c a-- --c agg --- -cg --- at- -g- --- --- g-g
V      M      R      T      T  S      V      E

```

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

----->
      95      100      105
L  S  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A
ctg agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca
      R      R      D      T
--- --- --g --- -g- --- --c --- a-g --c --g --- --- --g
      R      T

```

11E1 VH

X62106 IGHV1-2*02
IGHV1-46*01 (aminoácido)

```

--- CDR3 - IMGT -----<----- FR4 - IMGT
      110      115      120
I  G  G  Y  G  S  W  F  A  Y  W  G  Q  G  T
ata gga gga tat ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act
R
-g- -a

```

11E1 VH

```

----->
      126
L  V  T  V  S  A
ctg gtc act gtc tct gca

```

FIGURA 42A

CDR3 - IMGT <----- FR4 - IMGT ----->
110 115 120 126
G S W F A Y W G Q G T L V T V S A
11E1 VH ggg tcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca
M25625 IGHJ4*03 g- -ac --- -ac --- --- --- --- -c --- -c --- -c t-- g

FIGURA 42B

	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
	1 10 20	30	40 50	60
11E1 VH	QVQLQSGA.E LAK PGASVK M SCKAS	GYTFTSYW....	MN WVK Q RPQG L EW I G Y	INPTTGST..
rango	3 33 3		1 3 3 2 1	
FR Humano	---V---.-VK-----V----		-H--R-A-----M-I	
11E1 HZVH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYW....	MN WVRQAPQG L EW M G Y	INPTTGST..
	FR3-IMGT (66-104)	CDR3-IMGT (105-115)	FR4-IMGT (116-126)	
	70 80 90 100	110	120	
11E1 VH				
	DYN Q KL K .D K ATLTAD K SSNTAY M QLSSLTSEDSAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGT L VT V SA	
rango	1 23 332 2 1 1 33 2 3 3 3			3
FR Humano	S-A--FQ.GRV-M-R-T-TS-V--E---R---T-----		-----S	
11E1 HZVH	DYA Q K F Q.GRV T MT AD KSTSTV M ELSSLRSEDTAVYYC	AIGGYGSWFAY	WGQGT L VT V SS	

FIGURA 43

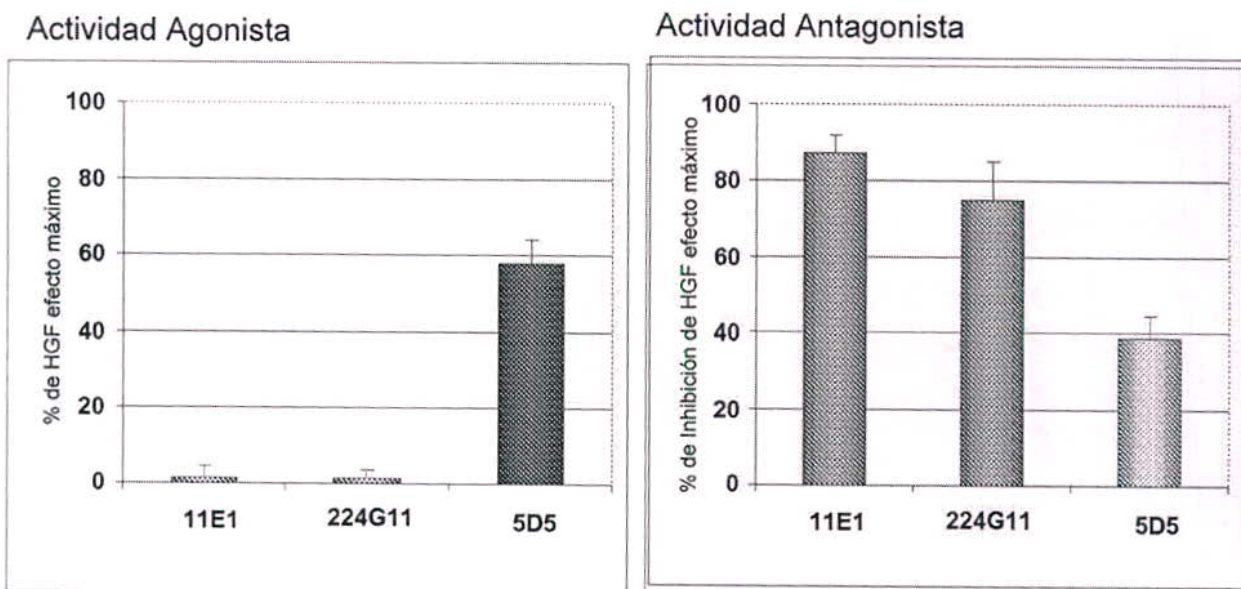


FIGURA 44A

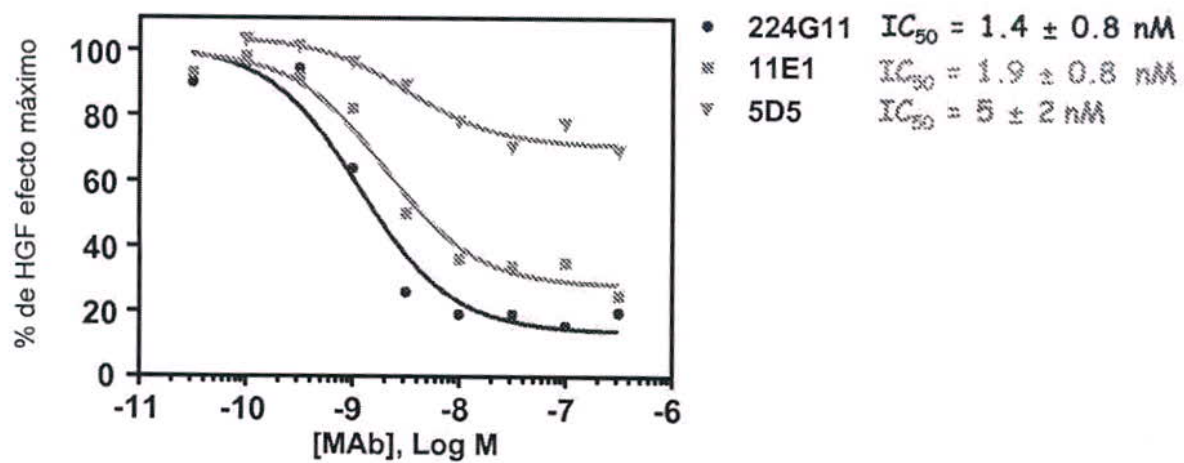


FIGURA 44B

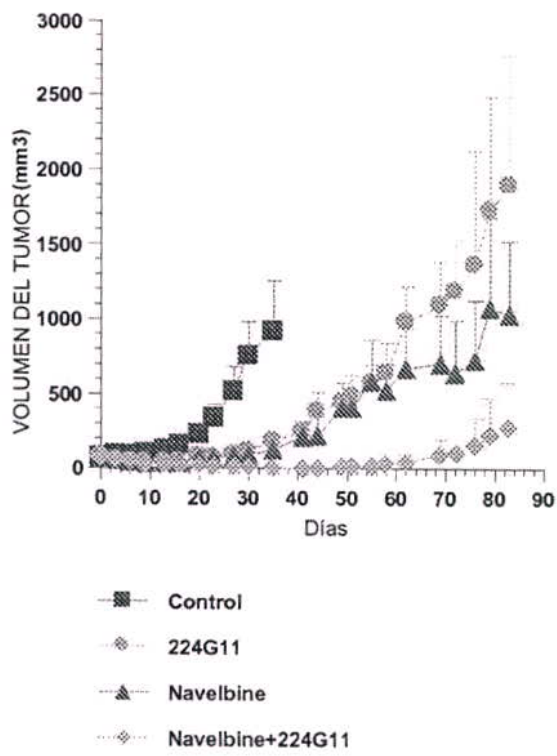


FIGURA 45

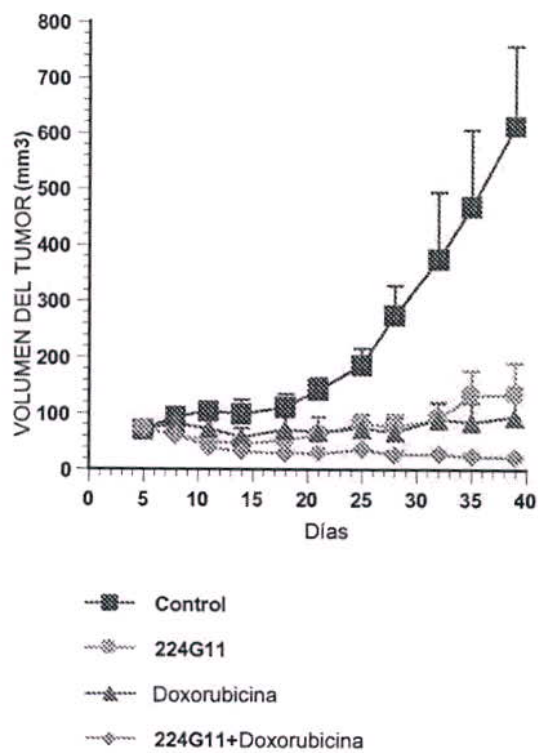


FIGURA 46

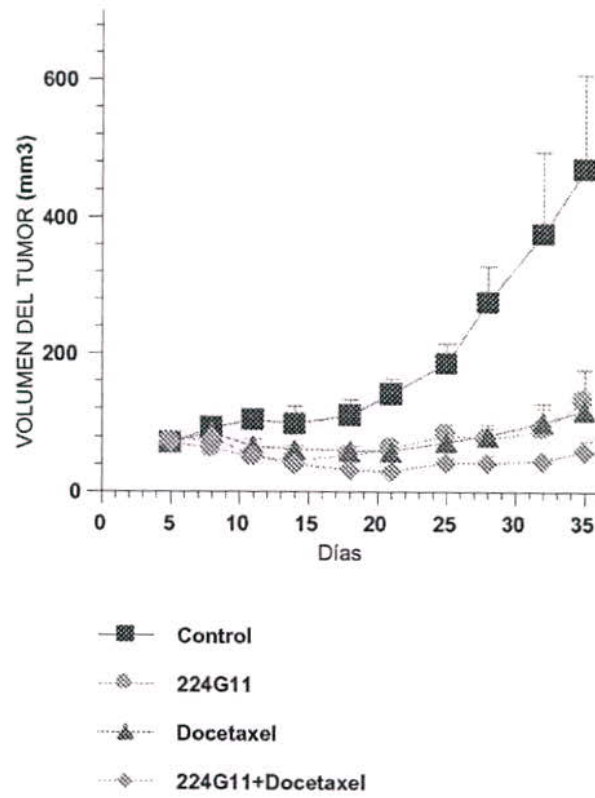


FIGURA 47

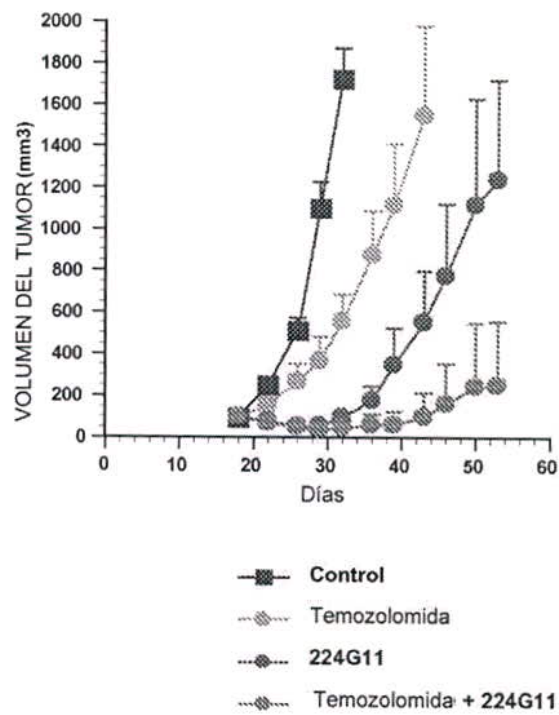


FIGURA 48

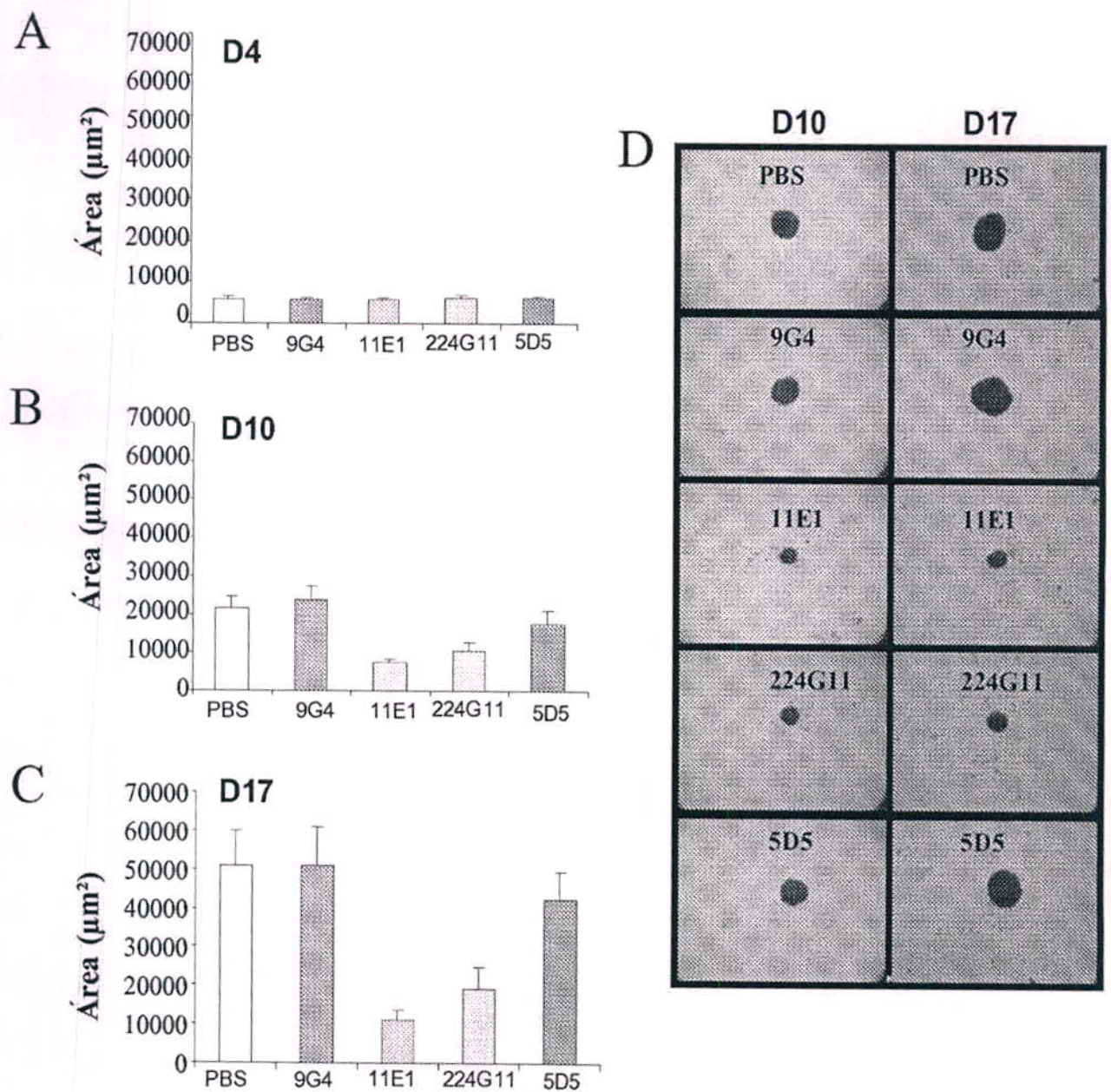


FIGURA 49A - FIGURA 49B - FIGURA 49C - FIGURA 49D

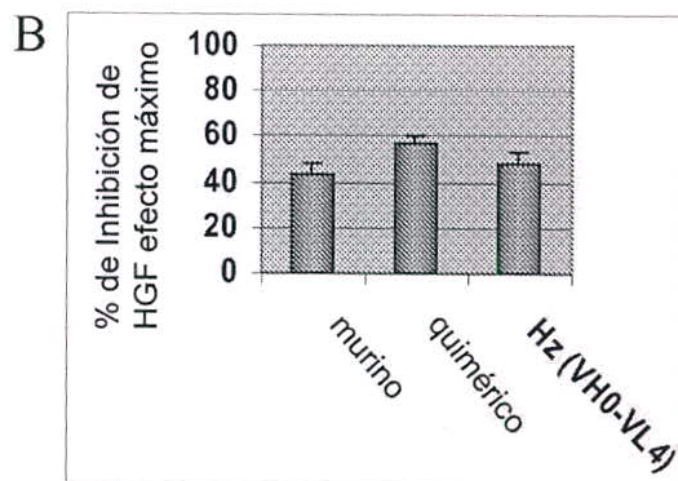
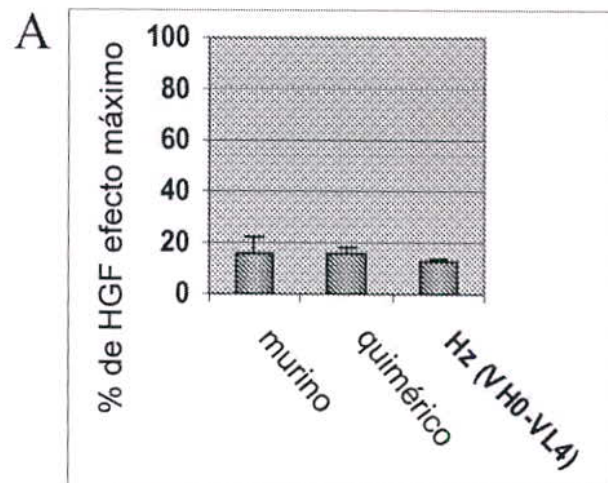


FIGURA 50A - FIGURA 50B



FIGURA 51

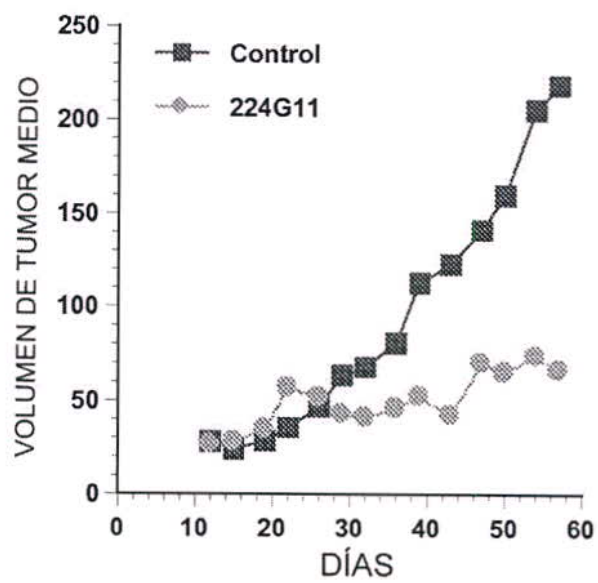


FIGURA 52

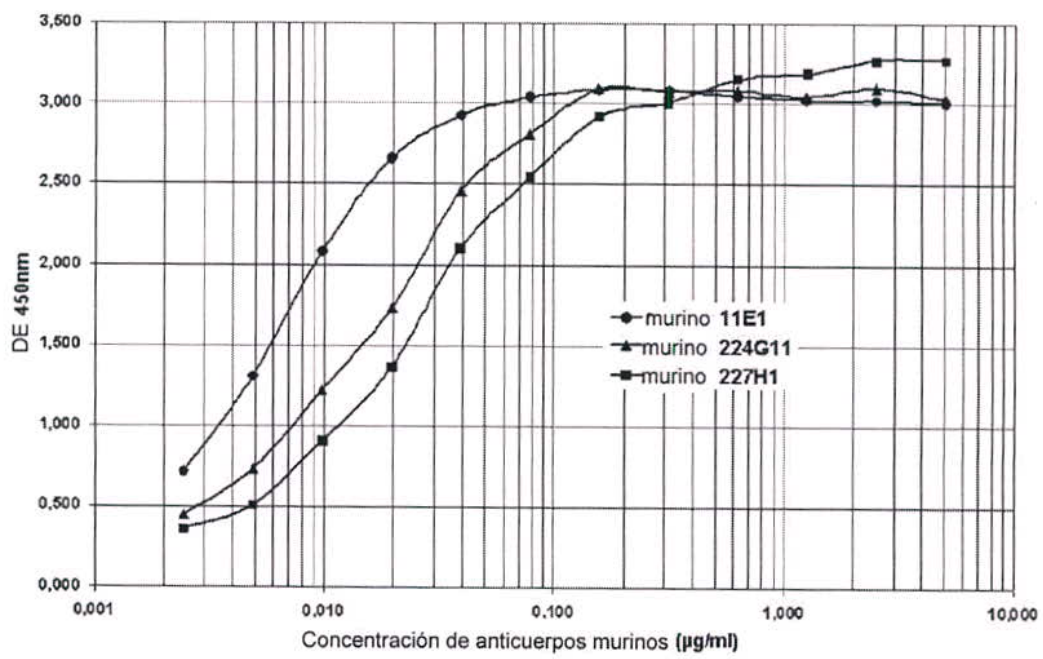


FIGURA 53

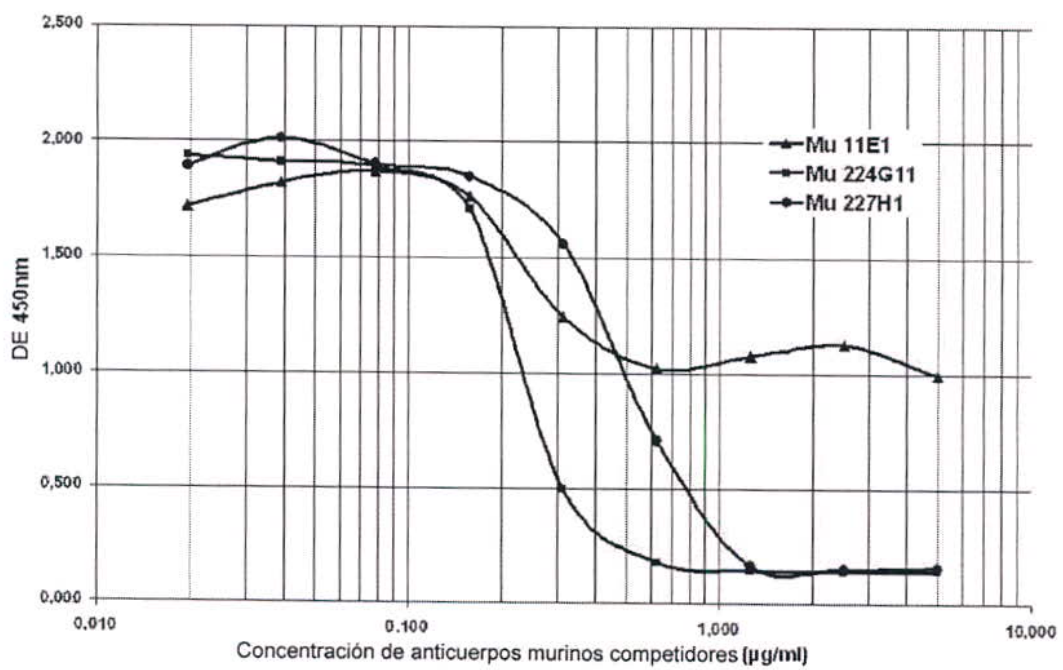


FIGURA 54

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)				FR2-IMGT (39-55)				CDR2-IMGT (56-65)			
	1102030				405060											
227H1 VH																
EVQLQQSGP.ELVKPGASMKISCKAS					GYSFTDYT....				LNWVKQSHGKTLEWIGL				INPYNGGT..			
FR Humano	Q---V---A.-VK-----V-V-----								MH--R-AP-QG---M-W							
Cambiado en	* * 2 *2 3 *								11 * 33 22 2 1							
227H1 HZ3VH	QVQLVQSGP.EVVKPGASMKVSCAS				GYSFTDYT....				LNWVRQSHGKTLEWIGL				INPYNGGT..			
227H1 HZ2VH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS				GYSFTDYT....				LNWVRQAPGKTLEWIGL				INPYNGGT..			
227H1 HZ1VH	QVQLVQSGA.EVKKPGASVKVSCAS				GYSFTDYT....				LNWVRQAPGQGLEWMGL				INPYNGGT..			

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)				FR4-IMGT (116-126)			
	708090100				110				120			
227H1 VH												
TYNQKFK.GKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC					AREEITKDFDF				WGQGTTLTVSS			
FR Humano	N-A---Q.-RV-M-R-T-I-----SR-R-D-T-----								-----LV-----			
Cambiado en	1 * 3 *2 2 1 1 3				** 3 3 *				22			
227H1 HZ3VH	TYAQKFK.GRATLTVDKSSSTAYMELSRLTSEDTAVYYC				AREEITKDFDF				WGQGTTLTVSS			
227H1 HZ2VH	TYAQKFQ.GRATLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC				AREEITKDFDF				WGQGTTLTVSS			
227H1 HZ1VH	TYAQKFQ.GRVTMTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC				AREEITKDFDF				WGQGTTLTVSS			

FIGURA 55

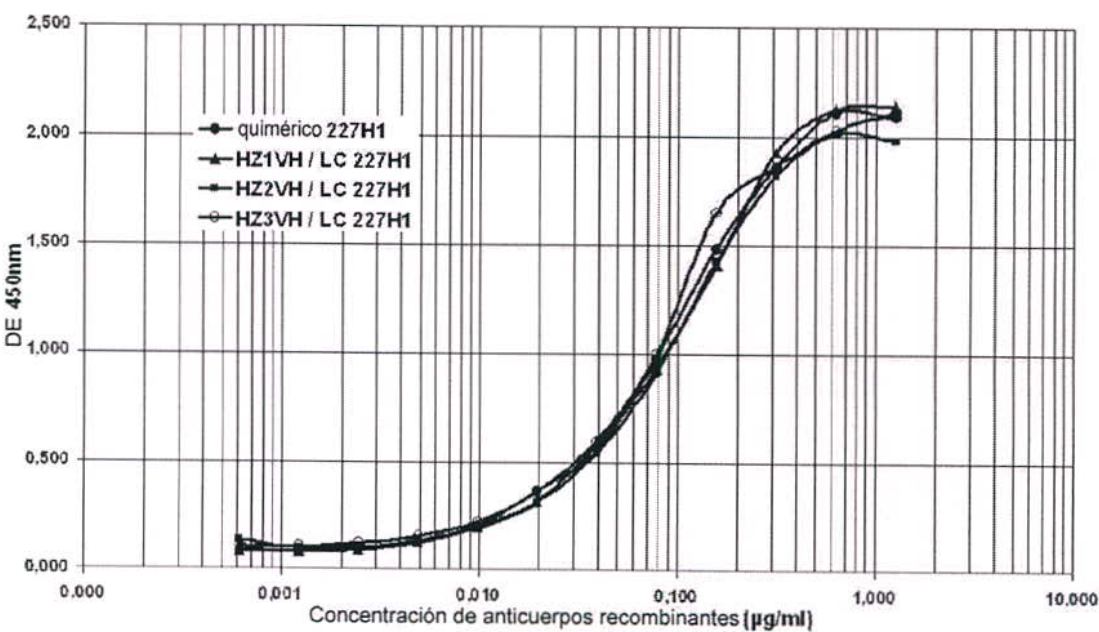


FIGURA 56

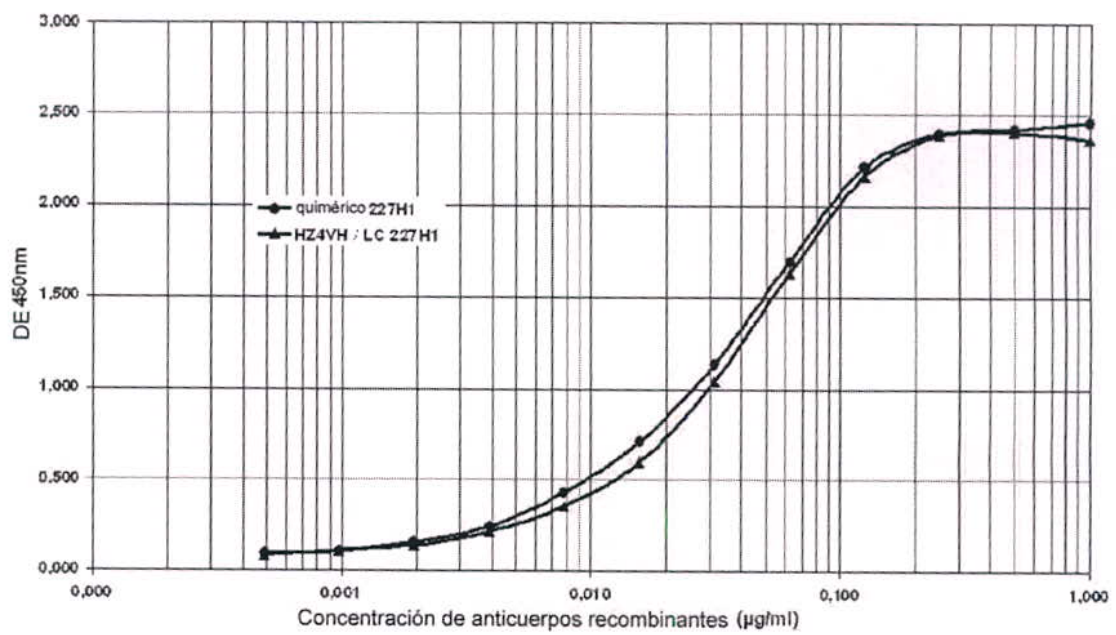


FIGURA 57

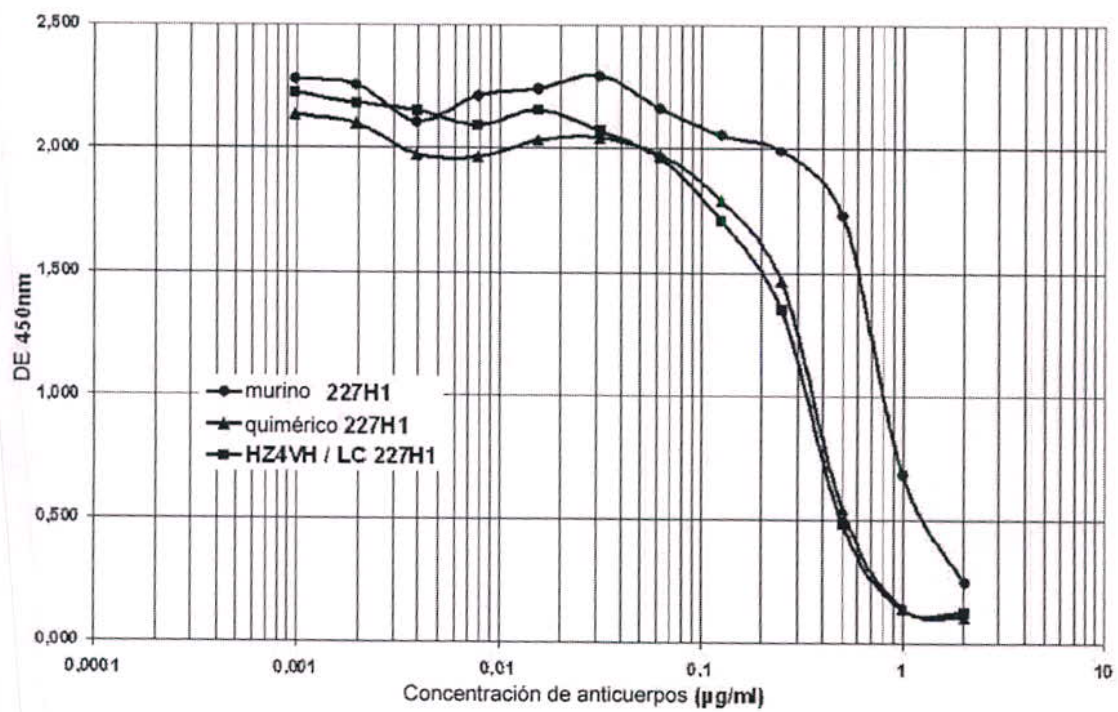


FIGURA 58

164

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30		40	50	60	
									
227H1-HZ VH	QVQLVQSGA	EVKKPGASVKV	SCKAS	GYSFTDYT		MHWVRQAPGQGLEWMGW	INPYNGGT	..	
humanización	* * ! * !	! *				\$\$ * !! !!	! \$		

FIGURA 59

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)		FR2-IMGT (39-55)		CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30		40	50	60	
11E1 VH									
FR Humano	QVQLQSGA	ELAKPGASVK	MSCKAS	GYTFTSYW		MNWKQRPQGQLEWIGY	INPTTGST	..	
Cambiado en	---V---	-VK-----V---				-H--R-A-----M-I			
	*	**	3			1 * *	2 1		
11E1 HZ VH3	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	MSCKAS	GYTFTSYW		MNWRQAPQGQLEWIGY	INPTTGST	..	
11E1 HZ VH2	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSKAS	GYTFTSYW		MNWRQAPQGQLEWIGY	INPTTGST	..	
11E1 HZ VH1	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSKAS	GYTFTSYW		MNWRQAPQGQLEWMGY	INPTTGST	..	
	FR3-IMGT (66-104)					CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-126)	
	70	80	90	100		110		120	
11E1 VH									
FR Humano	DYNQKLK	DKATLTADK	SNTAYMQL	SSLTSEDSAVYYC		AIGGYGSWFAY		WGQGT	LTVVSA
Cambiado en	S-A--FQ	GRV-M-R-T-TS-V--E----	R---T-----					-----S	
	1 3	23 3 2 2 1 1 33 2	3	*				*	
11E1 HZ VH3	DYNQKLK	DRATLTADK	SNTAYMEL	SSLTSEDTAVYYC		AIGGYGSWFAY		WGQGT	LTVVSS
11E1 HZ VH2	DYAQKLQ	GRATLTADK	STSTAYMEL	SSLRSEDTAVYYC		AIGGYGSWFAY		WGQGT	LTVVSS
11E1 HZ VH1	DYAQKFQ	GRVTMTADK	STSTVYMEL	SSLRSEDTAVYYC		AIGGYGSWFAY		WGQGT	LTVVSS

FIGURA 60

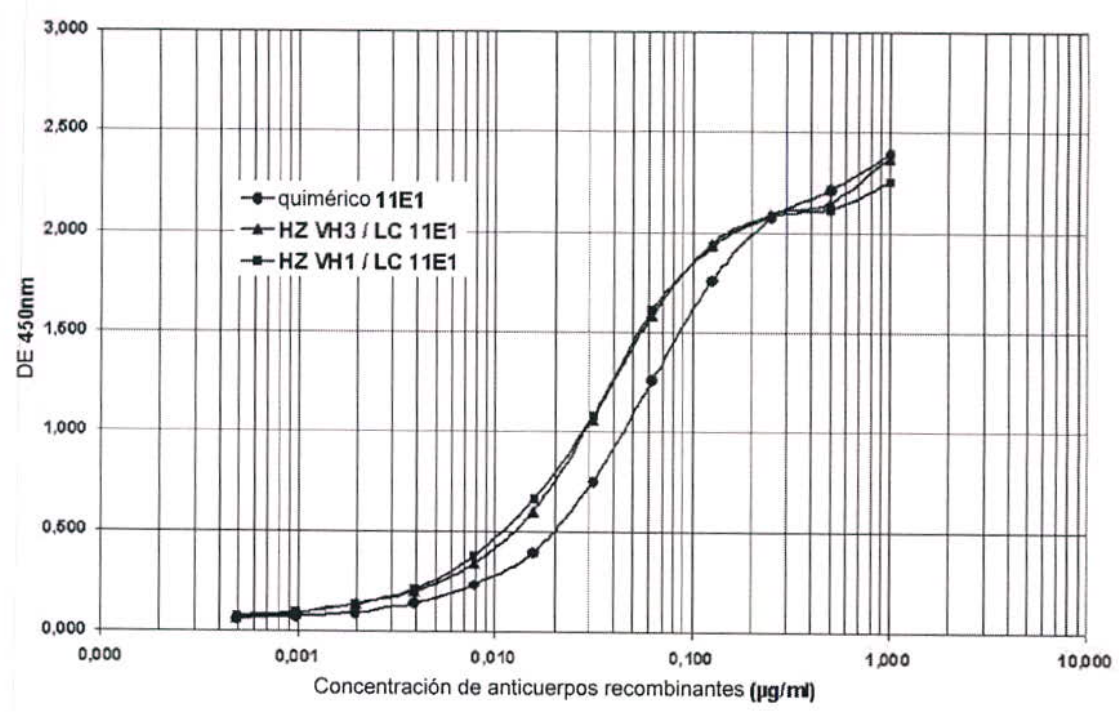


FIGURA 61

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)																			
	1	10	20		30	40	50	60																		
11E1 VL	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	L	T	C	S	A	S	
FR Humano	E	--	M	----	T	L	-	L	----	R	A	--	S	-	R	--										
Cambiado en	*	1																								
11E1 HZ VL3	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	M	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	S	A	S
11E1 HZ VL2	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	S	A	S
11E1 HZ VL1	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)																																
	70	80	90	100	110	120																																
11E1 VL	I	L	A	S	G	V	P	.	A	R	F	S	G	S	G	.	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	T	E	D	A	A	S	Y	F	C
FR Humano	T	R	-	T	-	I	-	.	-----	.	---	D	F	T	----	L	Q	P	--	F	-	V	-	Y	-													
Cambiado en	22	*	*													213				321		2	3	3														
11E1 HZ VL3	I	L	A	T	G	I	P	.	A	R	F	S	G	S	G	.	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	T	E	D	A	A	S	Y	F	C
11E1 HZ VL2	I	L	A	T	G	I	P	.	A	R	F	S	G	S	G	.	S	G	T	S	Y	T	L	T	I	S	S	L	E	T	E	D	A	A	V	Y	Y	C
11E1 HZ VL1	T	R	A	T	G	I	P	.	A	R	F	S	G	S	G	.	S	G	T	D	Y	T	L	T	I	S	S	L	Q	T	E	D	F	A	V	Y	Y	C

	110	120																	
11E1 VL	H	Q	W	S	S	P	F	T		F	G	S	G	T	K	L	D	I	K
FR Humano																			
Cambiado en																			
11E1 HZ VL3	H	Q	W	S	S	P	F	T		F	G	S	G	T	K	V	D	I	K
11E1 HZ VL2	H	Q	W	S	S	P	F	T		F	G	G	G	T	K	V	D	I	K
11E1 HZ VL1	H	Q	W	S	S	P	F	T		F	G	G	G	T	K	V	E	I	K

FIGURA 62

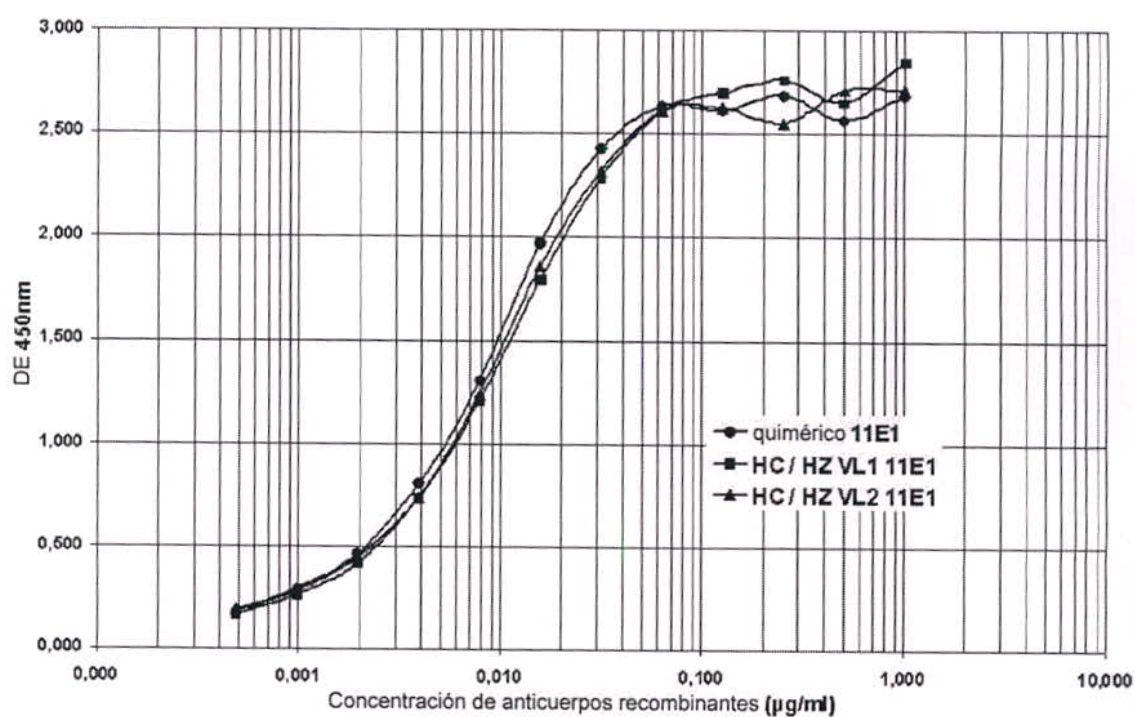


FIGURA 63

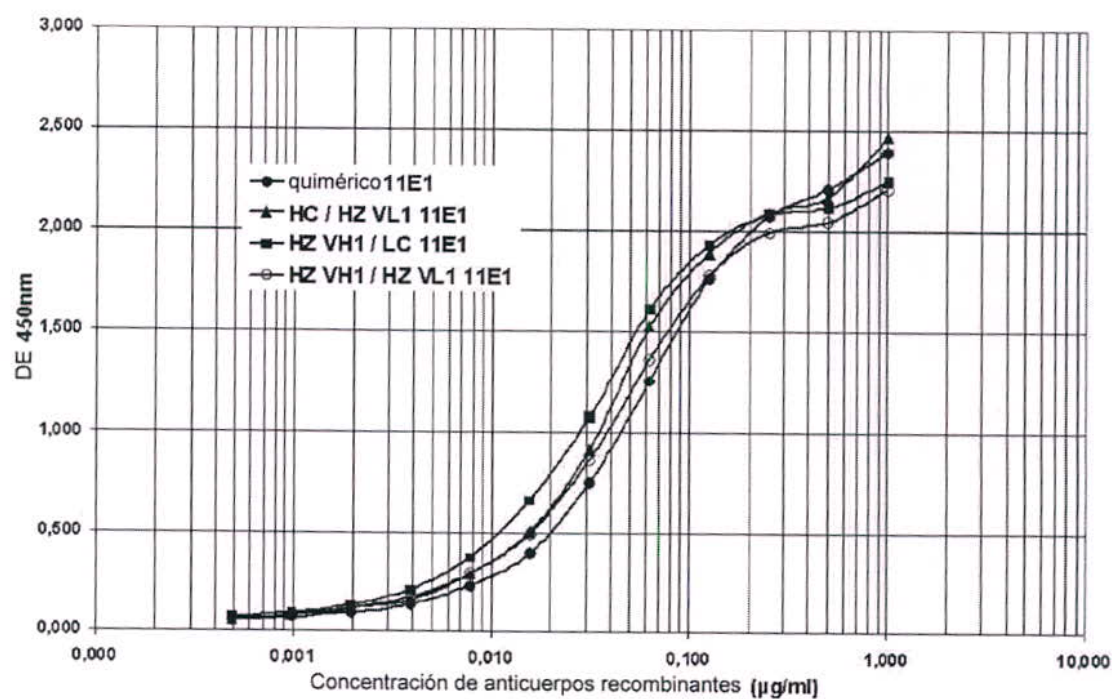


FIGURA 64

(6)

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
224G11 VH	EVQLQQSGP	ELVKPGASVKISCKTS	GYIFTAYT		MHWVRQSLGESLDWIGG	IKPNNGLA	..					
227H1 VH	EVQLQQSGP	ELVKPGASMKISCKAS	GYSFTDYT		LNWVKQSHGKTLEWIGL	INPYNGGT	..					
FR Humano	Q---V---A	-VK-----V---A-			-----AP-QG-E-M-W							
224G11 HZ VH0	QVQLVQSGA	EVKKPGASVKVSCAS	GYIFTAYT		MHWVRQAPGQGLEWMGW	IKPNNGLA	..					

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-115)		FR4-IMGT (116-126)	
	70	80	90	100	110	120		
224G11 VH	NYNQKFK	GKATLTVDKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYC			ARSEITTEFDY	WGQGTALTIVSS		
227H1 VH	TYNQKFK	GKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC			AREEITKDFDF	WGQGTTLTVSS		
FR Humano	--A--Q	-RV-M-R-T-I-----E-SR-R-D-T-----				-----LV-----		
224G11 HZ VH0	NYAQKFQ	GRVTMTRDTSISTAYMELSRLSRSDTAVYYC			ARSEITTEFDY	WGQGTTLTVSS		

FIGURA 65

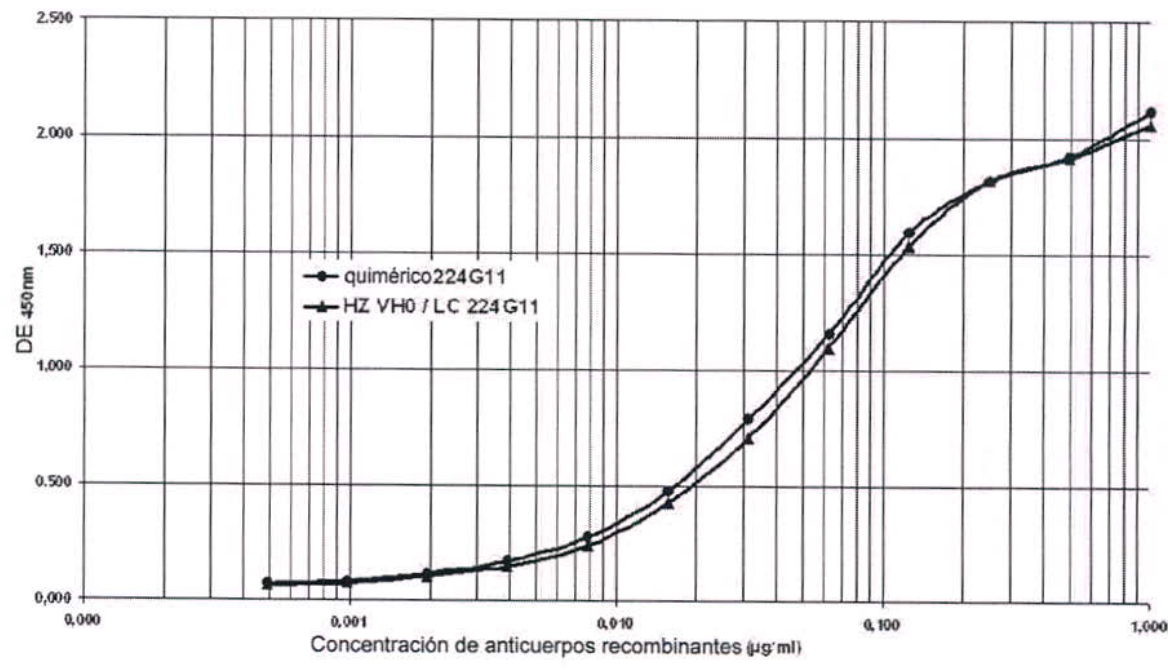


FIGURA 66

67/72

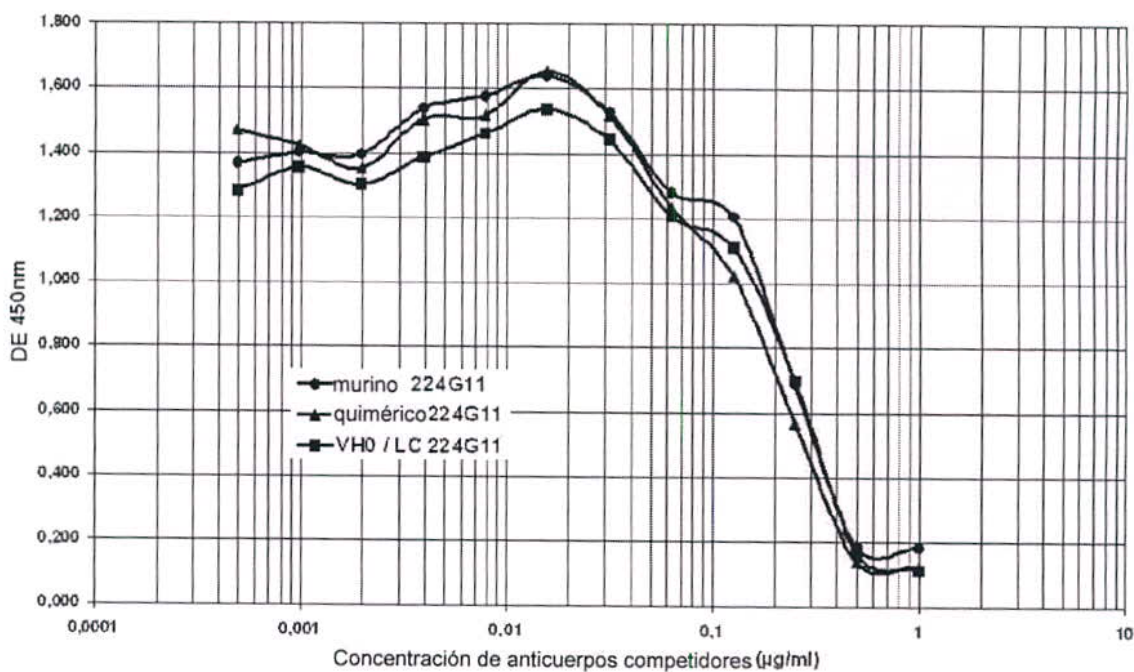


FIGURA 67

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)	
	1	10	20	30	40	50	60
224G11 VL							
	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS			ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQPPLLIY RAS.....		
Hu-FR más corto	E-----T-SL-P-E---L-----				LA-----A-R-----		
Rango	* * 3* 2 3 *				11 2 3		
224G11 HZ VL3	EIVLTQSPATLALSLGQRATLSCRAS			ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQPPLLIY RAS.....		
Hu-FR más largo	---M---D-----E---N-KS-				LA-----		
Rango	1 * 3 * 32				11		
224G11 HZ VL6	DIVLTQSPDSLAVSLGQRATINCRAS			ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQPPLLIY RAS.....		

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)	FR4-IMGT (114-123)
	70	80	90	100	110	120
224G11 VL						
	NLESGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPVEADDVATYYC				QSKEDPLT	FGSGTKLEMK
Hu-FR más corto	-RAT---.-----.-G-----SSL-PE-F-V---					--G---V-I-
Rango	22* 1 32* 33 2 3					3 * *
224G11 HZ VL3	NLETGIP.ARFSGSG..SRTDFTLTINPLEADDVATYYC				QSKEDPLT	FGSGTKVEIK
Hu-FR más largo	TR---V-.D-----.-G-----SSLQ-E---V---					--G---V-I-
Rango	22 * * 1 32*3 3 3					3 * *
224G11 HZ VL6	NLESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTINPLEADDVATYYC				QSKEDPLT	FGSGTKVEIK

FIGURA 68

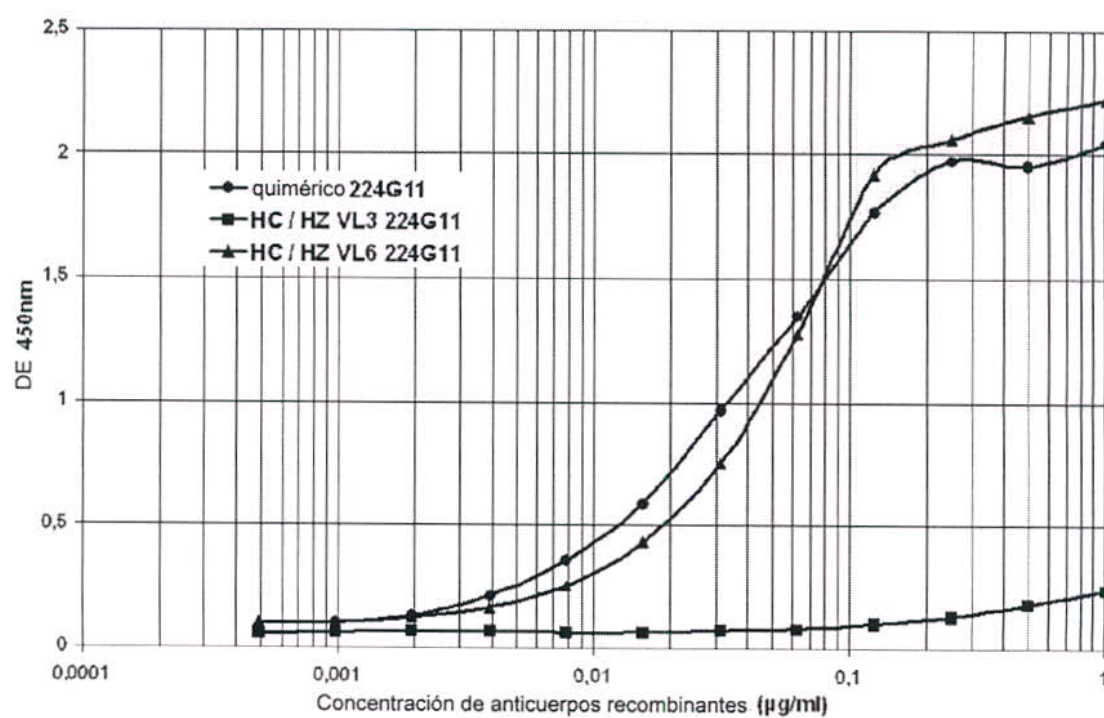


FIGURA 69

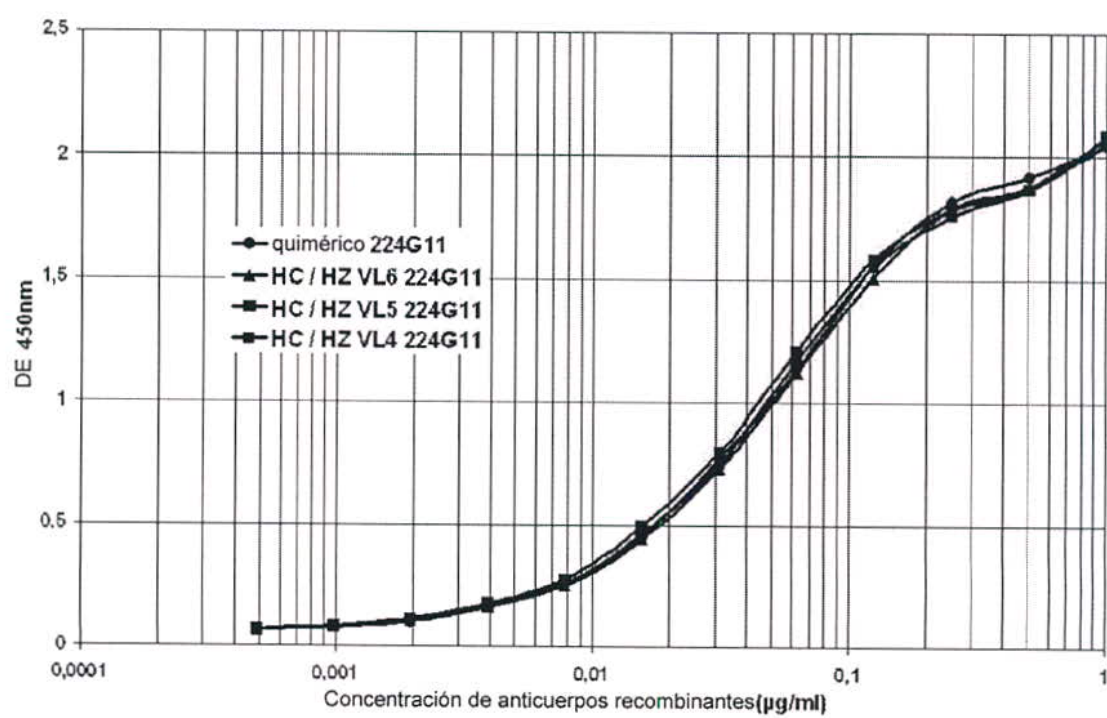


FIGURA 70

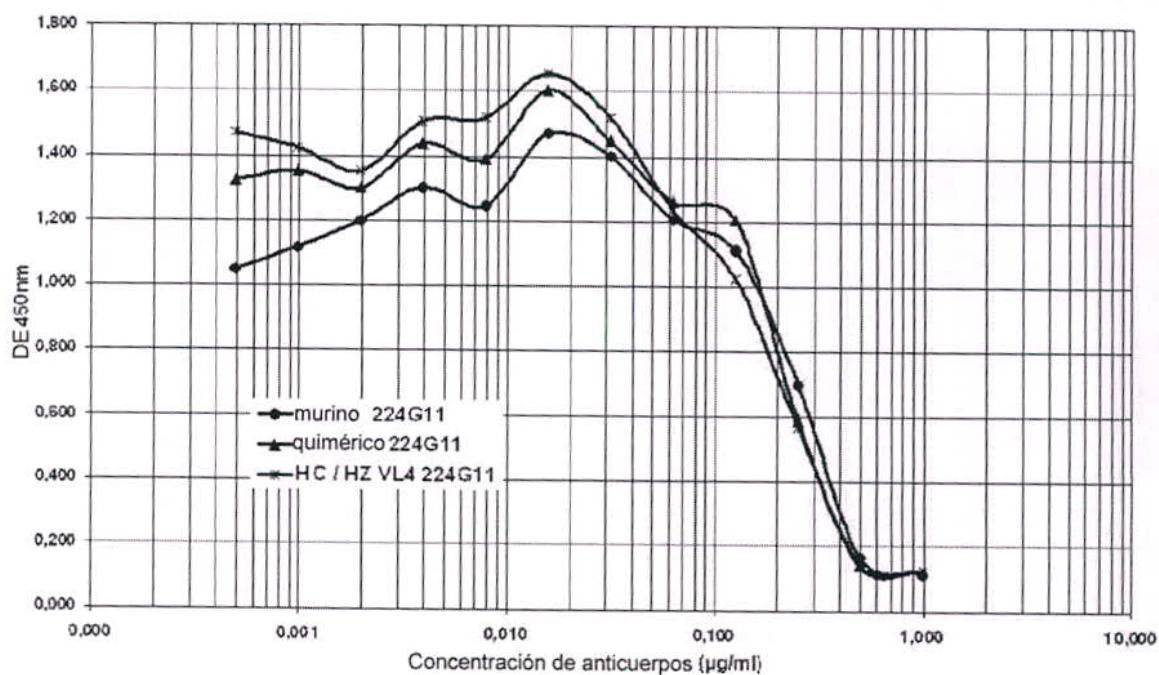


FIGURA 71

	FR1-IMGT (1-26)				CDR1-IMGT (27-38)				FR2-IMGT (39-55)				CDR2-IMGT (56-65)			
	1	10	20		30		40	50	60							
224G11 HZ VL4																
humanización	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	ESVDSYANSF..	MHWYQQKPGQPPLLIY	RAS.....												
	\$	*	!	* !!			SS									

	FR3-IMGT (66-104)				CDR3-IMGT (105-113)				FR4-IMGT (114-123)			
	70	80	90	100	110		120					
224G11 HZ VL4												
humanización	TRESGVP.DRFSGSG..SRTDFTLTISLQAEDVAVYYC	QSKEDPLT	FGGGTKVEIK									
	!!	* *	\$	!!*! !			!	*	*			

FIGURA 72

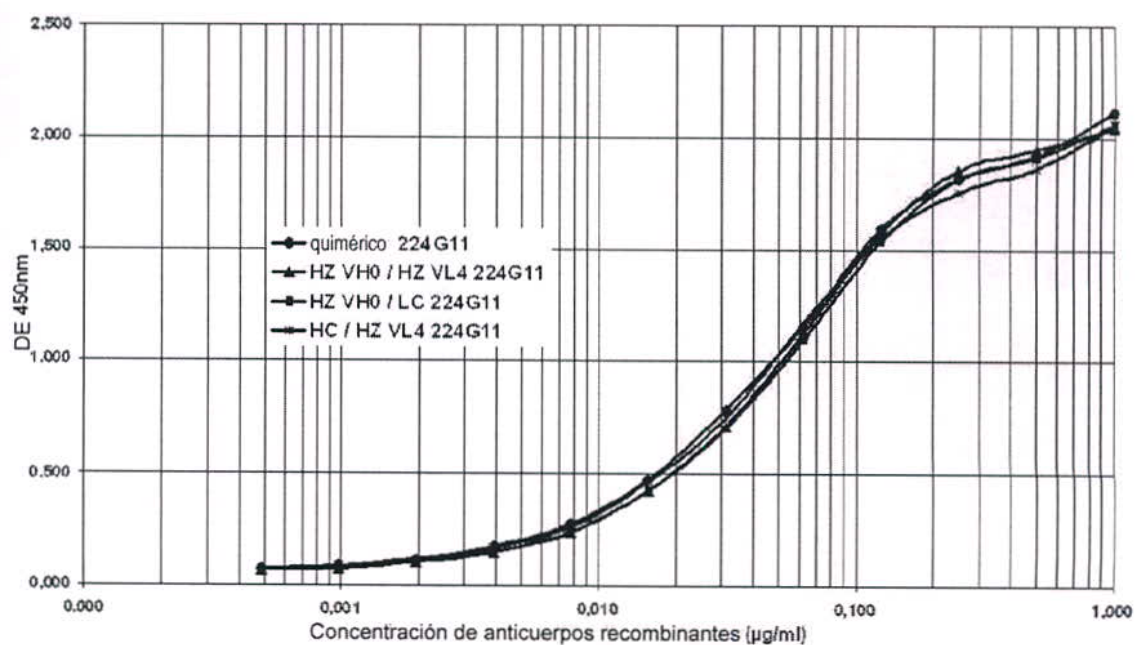


FIGURA 73

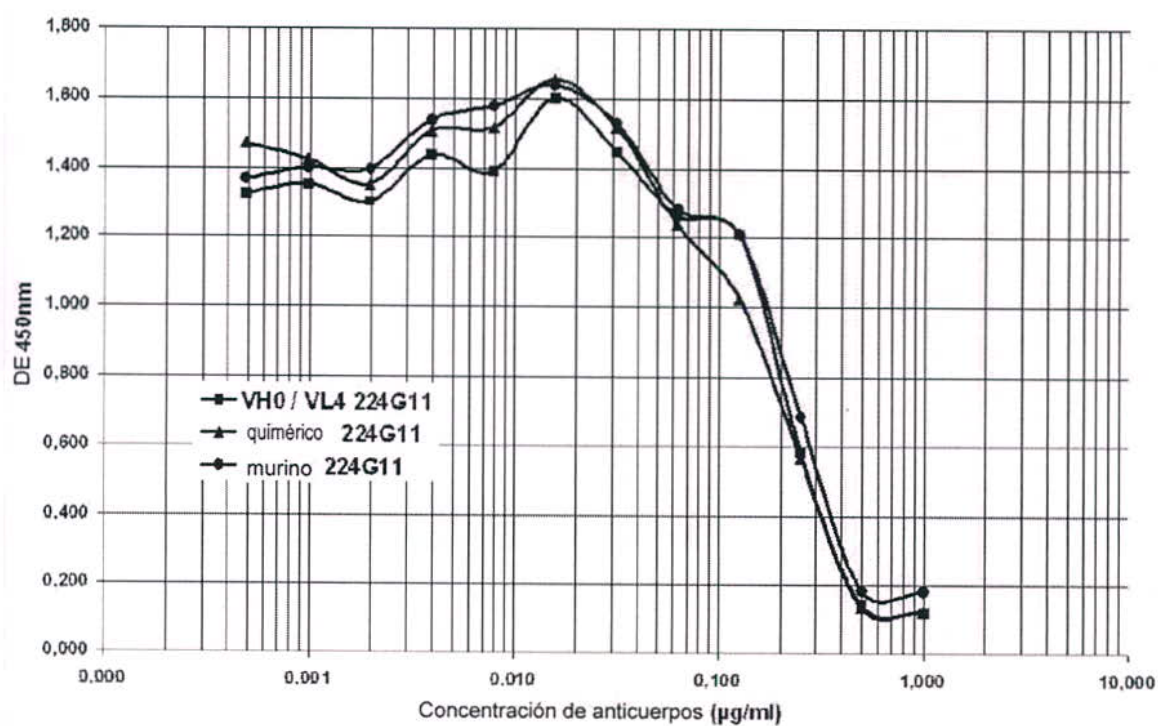


FIGURA 74

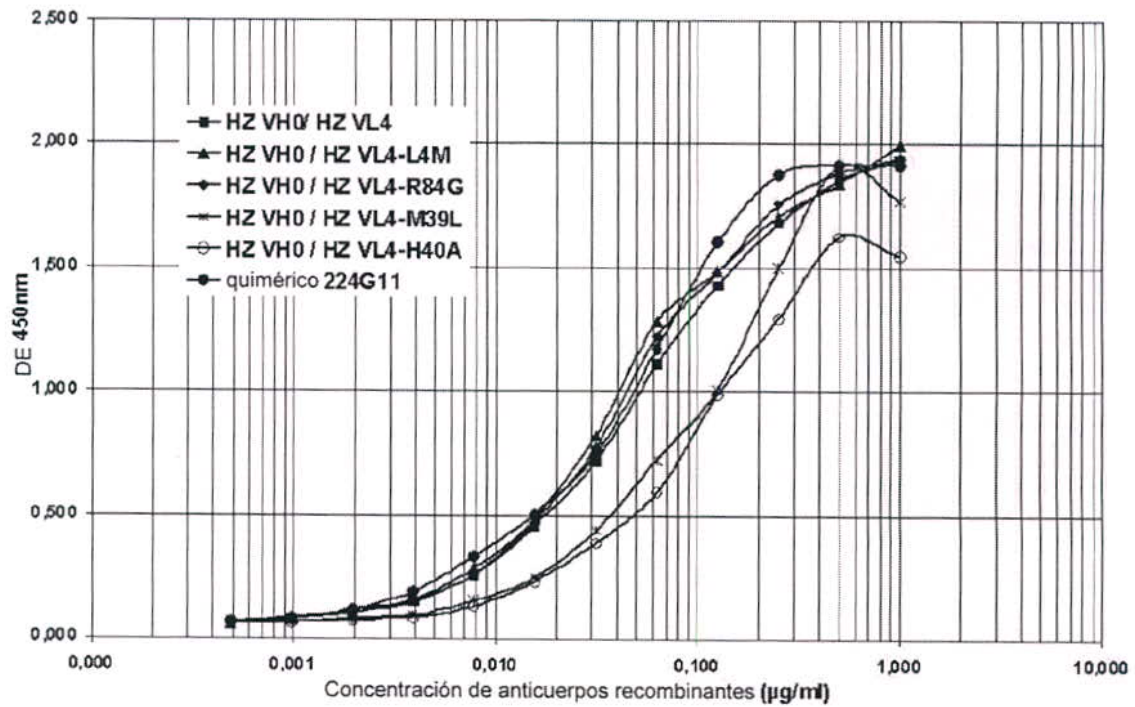


FIGURA 75

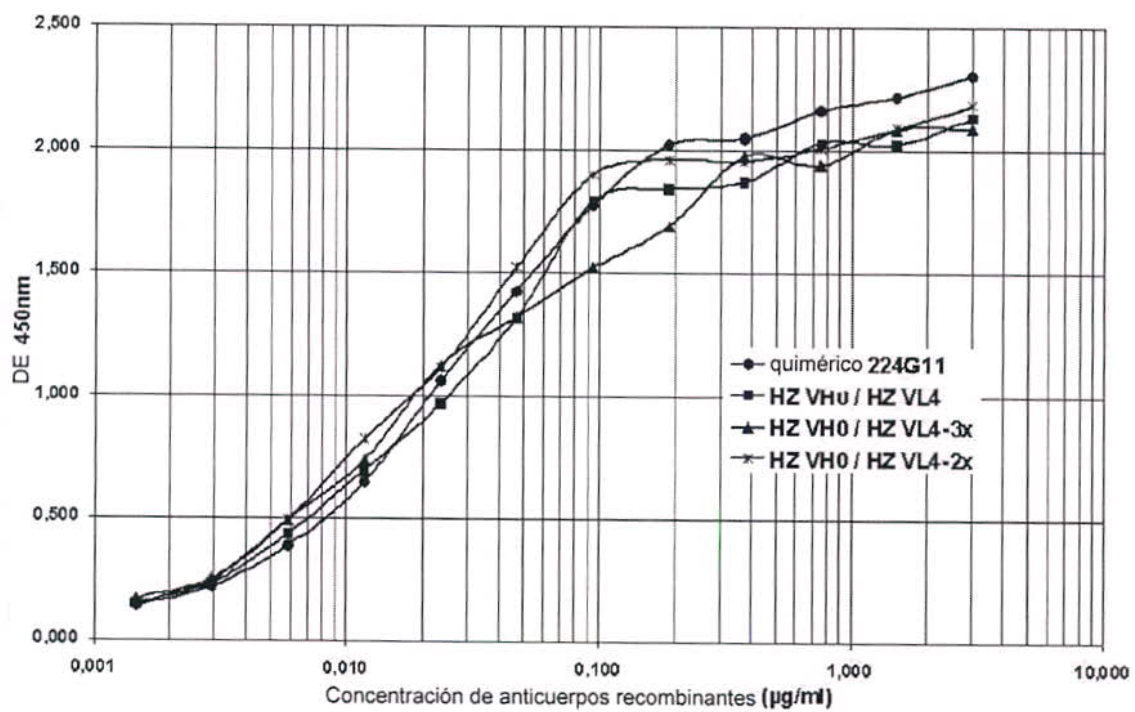


FIGURA 76

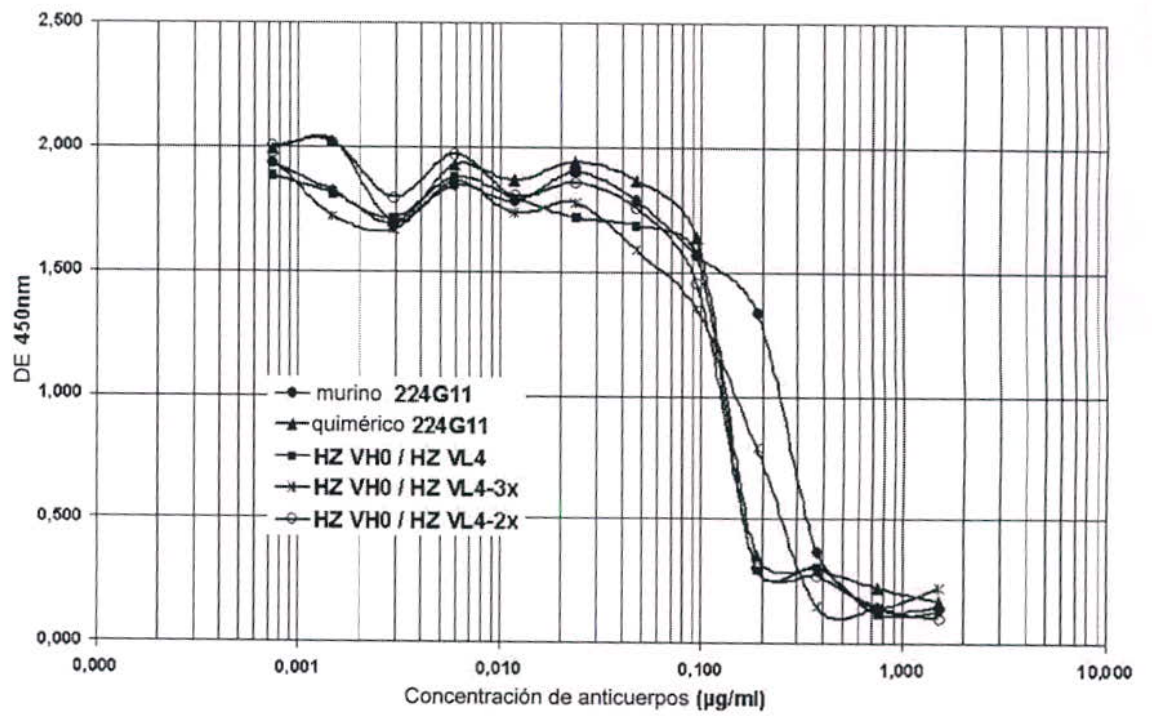


FIGURA 77

174

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> Novedosos anticuerpos que inhiben dimerización de
c-Met, y sus usos

<130> D25728

<140> PCT/EP2008/059026
<141> 2008-07-10

<150> EP 07301231.2
<151> 2007-07-12

<150> US 60/929,789
<151> 2007-07-12

<150> US 61/020,639
<151> 2008-01-11

<160> 71

<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> 8
<212> PRT
<213> mus musculus

<400> 4
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> mus musculus

178

<400> 5
 Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 6
 Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe
 1 5 10

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn
 1 5

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

<400> 8
 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 9
 Ala Arg Gly Arg Tyr Val Gly Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

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

<400> 10
 Glu Ser Val Asp Ser Tyr Ala Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 11
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 11
 Arg Ala Ser
 1

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 12
 Gln Gln Ser Lys Glu Asp Pro Leu Thr

17b

1 5

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 13
 Glu Ser Ile Asp Thr Tyr Gly Asn Ser Phe
 1 5 10

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 14

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 15
 Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 1 5

<210> 16
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 16
 Ala Ala Thr
 1

<210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 17
 Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 18
 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

177

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> 19
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Thr 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 Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Glu Ile Thr Lys Asp Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> mus musculus

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

<210> 21
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 21
 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
          100          105          110

```

<210> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> mus musculus

```

<400> 22
Gly 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 Val Ser Glu Ser Ile Asp Thr Tyr
          20          25          30
Gly Asn Ser Phe Ile 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 Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
          85          90          95
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys
          100          105          110

```

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> mus musculus

```

<400> 23
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1          5          10          15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
          20          25          30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
          35          40          45
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65          70          75          80
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Pro Pro Tyr
          85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 24
 ggatacatat tcactgcata cacc

24

<210> 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 25
 attaaaccaa acaatggctct tgct

24

<210> 26

179

<211> 33
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 26
 gcaagatctg agattacgac ggaatttgac tac 33

<210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 27
 ggttattcat tcactgacta cacc 24

<210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 28
 attaatacctt acaatggtgg tact 24

<210> 29
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 29
 gcaagagagg aaattacgaa ggactttgat ttc 33

<210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 30
 ggatacacat tcactgacta caac 24

<210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 31
 attaataccta acaatggtgg tact 24

<210> 32
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 32
 gcaagagggg ggtatggtgg ttactactat gctatggact ac 42

<210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 33
 gaaagtgttg atagttatgc caatagtttt 30

<210> 34
 <211> 9
 <212> DNA

180

<213> mus musculus
 <400> 34
 cgtgcatcc 9
 <210> 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 35
 cagcaaagta aggaggatcc tctcacg 27
 <210> 36
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 36
 gaaagtattg atacttatgg caatagtttt 30
 <210> 37
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 37
 cagcaaagta atgaggatcc attcacg 27
 <210> 38
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 38
 gagaatatatt acagtaat 18
 <210> 39
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 39
 gctgcaaca 9
 <210> 40
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 40
 caacattttt ggggtcctcc gtacacg 27
 <210> 41
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> mus musculus
 <400> 41
 gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgcaaga cttctggata catattcact gcatacacca tgcactgggt gaggcagagc 120
 cttggagaga gccttgactg gattggaggt attaaaccaa acaatgggtc tgctaactac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggacctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcagtct attactgtgc aagatctgag 300
 attacgacgg aatttgacta ctggggccaa ggcaccgctc tcacagtctc ctca 354
 <210> 42

191

<211> 354
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 42
 gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagatt 60
 tcctgcaagg cttctgggta ttcattcact gactacaccc tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga cccttgagtg gattggactt attaatcctt acaatgggtg tactacctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240
 atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagaggaa 300
 attacgaagg actttgattt ctgggggcaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 43
 <211> 363
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 43
 gaggtcctgc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 ccctgcaagg cttctgggata cacattcact gactacaaca tggactgggt gaagcagagc 120
 catggaatga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatgggtg tactatcttc 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagagggagg 300
 tatgttggtt actactatgc tatggactac tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 44
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 44
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atatcctgca gagccagtga aagtgttgat agttatgcca atagttttat gcactgggtac 120
 cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
 gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
 cctgtggagg ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaagga ggatccctctc 300
 acgttcggct cggggacaaa attggaaatg aaa 333

<210> 45
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 45
 ggcattgtgt tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctaggaca gagggccacc 60
 atatcctgca gagtcagtga aagtattgat acttatggca atagttttat acactgggtac 120
 cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct 180
 gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240
 cctgtggagg ctgatgattc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccattc 300
 acgttcggct cggggacaaa gttggaaatg aaa 333

<210> 46
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> mus musculus

<400> 46
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagtagatgg tgtgccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
 gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggtc ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggagataaa g 321

<210> 47
 <211> 24
 <212> DNA

182

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para gen doméstico proteína Ribosomal, grande, P0 (RPL0)

<400> 47

gaaactctgc attctcgctt cctg 24

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para gen doméstico proteína Ribosomal, grande, P0 (RPL0)

<400> 48

aggactcggtt tgtaccggtt ga 22

<210> 49

<211> 26

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para gen doméstico proteína Ribosomal, grande, P0 (RPL0)

<400> 49

tgcagattgg ctacccaact gttgca 26

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para HGF

<400> 50

aacaatgcct ctggttcc 18

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para HGF

<400> 51

ctttagctg cgtcctttac 20

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Sonda para HGF

<400> 52

ccttcaatag catgtcaagt ggagtga 27

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

143

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para c-Met

<400> 53

cattaaagga gacctcacca tagctaata

28

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador para c-Met

<400> 54

cctgatcgag aaaccacaac ct

22

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Sonda para c-Met

<400> 55

catgaagcga ccctctgatg tocca

25

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1

5

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 57

Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr

1

5

<210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 58

Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 59

Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr

184

1 5
 <210> 60
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 60
 Thr Thr Ser
 1

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 61
 His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 62
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 62
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ile Gly Gly Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 63
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> mus musculus

<400> 63
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Thr
 20 25 30
 Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Thr Thr Ser Ile Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
 65 70 75 80
 Thr Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 64
 <211> 24

AS

<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 64
ggctacactt ttacttccta ctgg 24

<210> 65
<211> 24
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 65
attaacccta ccaactgggtc tact 24

<210> 66
<211> 33
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 66
gcaataggag gatatgggtc ctggtttgct tac 33

<210> 67
<211> 21
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 67
tcaagtgtaa gttccaccta c 21

<210> 68
<211> 9
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 68
accacatcc 9

<210> 69
<211> 27
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 69
catcagtga gtagttaccc attcacg 27

<210> 70
<211> 354
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 70
caggtccagc ttcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctgggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacttttact tctactgga tgaactgggt gaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaacccta ccaactgggtc tactgactac 180
aatcagaagt taaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240
atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aataggagga 300
tatgggtcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 71
<211> 324
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 71
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctggggga gaaggtcacc 60

186

ttgacctgca	gtgccagctc	aagtgtaagt	tccacctact	tgtactggta	ccagcagaag	120
ccaggatcct	ccccaaaact	ctggatttat	accacatcca	tcctggcttc	tggagtcctt	180
gctcgcttca	gtggcagtg	gtctgggacc	tcttactctc	tcacaatcag	cagcatggag	240
actgaagatg	ctgcctctta	tttctgccat	cagtggagta	gttaccatt	cacgttcggc	300
tcggggacaa	agttggacat	aaaa				324

187

352985D25728

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application PIERRE FABRE MEDICAMENT is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from GOETSCH, Liliane to PIERRE FABRE MEDICAMENT, dated 11 February 2008 (11.02.2008)

352985D25728

5/9

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application PIERRE FABRE MEDICAMENT is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i v)		an assignment from GOETSCH, Liliane to PIERRE FABRE MEDICAMENT, dated 11 March 2008 (11.03.2008)

125303 188

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0048429
		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. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
12 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	360.000.00
				\$360.000.00

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-169787- -00000-0000
Fecha: 2013-07-17 16:53:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-016035- -00009-0000
Fecha: 2013-07-17 16:53:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 189

149

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



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0020263

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 INVENCION CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
				\$450.000.00

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

Responsable: [Signature]

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-169787-00000-0000

Fecha: 2013-07-17 16:53:32
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-016035-00009-0000

Fecha: 2013-07-17 16:53:32
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 851 DIVISIONAL

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 189

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

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

Febrero 28 de 2013 - 08:38:24