

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 864**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07704350 .3**
96 Fecha de presentación: **05.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1981981**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-MET, SUS FRAGMENTOS Y VECTORES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES Y PRODUCTOS CORRESPONDIENTES.**

30 Prioridad:
06.02.2006 EP 06101345

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

73 Titular/es:
**METHERESIS TRANSLATIONAL RESEARCH SA
VIA ALLA CAMPAGNA 2/A
6900 LUGANO, CH**

72 Inventor/es:
**COMOGLIO, Paolo Maria;
VIGNA, Elisa y
GIORDANO, Silvia**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 864 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales Anti-Met, sus fragmentos y vectores para el tratamiento de tumores y productos correspondientes

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal, fragmentos y/o partes del mismo, y el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monoclonal, fragmentos y/o partes del mismo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores y metástasis y dispositivos de diagnóstico para detectar células neoplásicas, o bien in vivo, o in vitro. En particular, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal anti-cMet dirigido contra el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.

Antecedentes de la invención

15 La exploración científica de la inmunoterapia del cáncer comenzó en los años 1950 y la primera aplicación dependía de anticuerpos policlonales. Hoy, después de más de cinco décadas, inmunoterapia con anticuerpos monoclonales continúa ofreciendo una prometedora alternativa para el tratamiento de cáncer (1,2). Varios anticuerpos que dirigen receptores de tirosina quinasa (RTK) en cáncer se usan actualmente en la práctica clínica (3). El mecanismo de acción de estos anticuerpos es diferente en diferentes casos, y - a pesar de los ejemplos de aplicación exitosa - a menudo, se entiende escasamente (4). Bevacizumab y Cetuximab dirigen VEGF-VEGFR y EGF-EGFR, respectivamente, y actúan evitando la interacción ligando-receptor, (5,6). Herceptin es un anticuerpo monoclonal específico para HER2, un miembro de la familia EGFR. El mecanismo de acción que es el fundamento de la eficacia de Herceptin no está completamente claro pero se ha mostrado que promueve la degradación de HER2, disminuyendo de este modo los niveles de receptor en la superficie de las células tumorales (7).

20 En oncogen MET, que codifica el receptor de tirosina quinasa para el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), controla los programas genéticos que conducen al crecimiento celular, invasión y protección de apoptosis. La activación no regulada de HGFR es crítica no solamente para la adquisición de propiedades tumorigénicas sino también para el logro del fenotipo invasivo (8). El papel de MET en tumores humanos surgía de varios planteamientos experimentales y se probó inequívocamente por el descubrimiento de mutaciones de activación de MET en formas heredadas de carcinomas. (9,10). Además, la activación constitutiva de HGFR es frecuente también en cánceres esporádicos y los estudios de este y otros laboratorios han mostrado que el oncogen MET se sobreexpresa en tumores específicos de histotipos o se activa mediante mecanismos autocrinos. Además, el gen MET se amplifica en metástasis hematogénea de carcinomas colorrectales (11). La interferencia con la activación de Met llega a ser de este modo un planteamiento desafiante para impedir los procesos tumorigénicos y metastáticos. En los años pasados, se han propuesto varias estrategias para bloquear la señalización aberrante de HGFR, dirigiendo o bien el propio HGFR o su ligando. Estos planteamientos incluyen el uso de Antagonistas de HGF, anticuerpos neutralizantes de HGF, señuelos de HGFR, inhibidores de HGFR del sitio de unión de ATP de molécula pequeña o pequeñas moléculas tales como geldanamicina, polipéptidos y ribozimas de dominio SH2 (revisado en 12).

35 Por ejemplo el documento WO 2005/016382 describe algunos de tales anticuerpos anti-HGFR de bloqueo. El documento WO 2005/016382 adicionalmente describe anticuerpos anti-HGFR (c-Met) agonísticos y propone el uso de estos anticuerpos agonísticos para la promoción de cicatrización de heridas pero no para la inhibición del crecimiento de células tumorales.

40 Cortesina et al. (INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, 2005, vol. 89, no. 3, páginas 286 - 292) describen un anticuerpo DN-30 que se dirige contra el dominio extracelular del receptor MET. Dicho anticuerpo DN-30 se usa bajo el nombre AntiMET-R en la memoria descriptiva subyacente. Sin embargo, la terapéutica de la eficacia de dicho anticuerpo o el hecho de que el desprendimiento del dominio extracelular del receptor de MET se induce por este anticuerpo no se conocía previamente.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular del Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGFR) en el tratamiento de tumores y/o metástasis en un sujeto afectado por un tumor y en dispositivos de diagnóstico para detectar células neoplásicas, o bien in vivo, o in vitro.

De este modo el objeto de la presente invención es, el uso de of i) un anticuerpo monoclonal anti-cMet, ii) un fragmento que contiene la región de unión a epítipo de un anticuerpo monoclonal anti-cMet y/o iii) un anticuerpo modificado por ingeniería genética que contiene la región de unión a epítipo o las regiones determinantes complementarias (CDR) de un anticuerpo monoclonal anti-cMet para la preparación de un medicamento para el

tratamiento de tumores y metástasis en un sujeto que sufre un tumor y para dispositivos de diagnóstico para detectar células neoplásicas, o bien in vivo, o in vitro, en el que el anticuerpo monoclonal anti-cMet - llamado AntiMET-R – lo produce la línea celular de hibridoma depositada por el Centro de Biotecnología Avanzada (ABC), Colección de Líneas Celulares Interlab (ICLC), S.S. Banca Cellule e Colture in GMP, Largo Rosanna Benzi 10, Génova, Italia con número de acceso ICLC PD 05006.

Otro objeto de la presente invención es el uso de un vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la región de unión a epítipo o las CDR del anticuerpo monoclonal anti-cMet producido por la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores y metástasis en un sujeto afectado por un tumor.

Otro objeto de la presente invención es el uso de i) el anticuerpo monoclonal anti-cMet, ii) un fragmento que contiene la región de unión a epítipo del anticuerpo monoclonal anti-cMet y/o iii) un anticuerpo modificado por ingeniería genética que contiene la región de unión a epítipo o las CDR del anticuerpo monoclonal anti-cMet y al menos un inhibidor de quinasa como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia de tumor y/o metástasis.

De acuerdo con la presente invención, estos propósitos se logran por medio de las reivindicaciones que siguen, que son parte integral de la enseñanza técnica proporcionada en el presente documento con respecto a la invención.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1. AntiMET-R altera la activación de HGFR y transducción de señal (A) Evaluación de la activación de HGFR. Células GTL16 se expusieron a AntiMET-R para los tiempos indicados. HGFR se inmunoprecipitó de los lisados celulares y se sondaron transferencias de Western con los Abs indicados. El tratamiento con AntiMET-R dio como resultado una disminución de la activación del receptor más pronunciada que la regulación descendente del receptor, como se ha indicado por cuantificación de densidad de bandas. (B) Análisis de señalización de HGFR. Las células se trataron previamente con o bien VSV-G o AntiMET-R y después se estimularon con HGF durante los tiempos indicados. La fosforilación de Akt se evaluó en el lisado total de células. Como se muestra en el panel superior, AntiMET-R reduce la activación de Akt tanto basal como la inducida por HGF.

- Figura 2. AntiMET-R inhibe el fenotipo transformado de células cancerosas in vitro. (A) Crecimiento independiente del anclaje de células GTL16. Se sembraron células tratadas previamente en agar al 0,5 %. Después las células se mantuvieron en la presencia de las cantidades indicadas de Abs AntiMET-R o VSV-G y después de 10 días, se tiñeron las colonias desarrolladas. El crecimiento independiente del anclaje se inhibió notablemente incluso a bajas dosis de AntiMET-R. (B) Ensayo de invasión. MDA-MB-435 β 4 se trataron previamente con los anticuerpos indicados durante 24 horas antes de sembrar sobre una cámara Transwell recubierta con matrigel. La cámara inferior se cargo con DMEM 2 % FBS +100 ng/ml HGF. Después de 24 horas, se tiñeron las células migradas y se contaron. La capacidad invasiva en respuesta a HGF se expresa como veces de incremento en comparación con células no estimuladas. Como se muestra, el tratamiento con AntiMET-R reduce significativamente la invasión celular.

- Figura 3. AntiMET-R inhibe el fenotipo transformado de células cancerosas in vivo (A, B) Ensayo de tumorigénesis. A ratones desnudos se les inyectaron por vía subcutánea $1,5 \times 10^6$ células GTL16. Después de la aparición de tumor, se seleccionaron ratones que muestran tumores del mismo tamaño y después les se inyectaron in situ dos veces a la semana 2 μ g/gr de o bien VSV-G o AntiMET-R. Se midió el volumen de tumor en diferentes momentos (A). Como se muestra, AntiMET-R alteró el crecimiento de tumor en ratones desnudos injertados con células tumorales humanas. Los ratones se sacrificaron 8 semanas después de tratamiento y se evaluó el peso del tumor (B). En ratones tratados con AntiMET-R, los tumores eran significativamente más pequeños que en los ratones control ($p < 0,05$). (C) Evaluación de la activación de HGFR. Las secciones de tumor de los ratones tratados con VSV-G (panel A), o AntiMET-R (panel B) se tiñeron con anti-humano fosfo-HGFR.

El análisis inmunohistoquímico de los tumores reveló que los niveles de HGFR disminuían notablemente en ratones tratados con AntiMET-R.

- Figura 4. El tratamiento con AntiMET-R interfiere con la progresión del tumor in vivo. A ratones desnudos se les inocularon por vía subcutánea $2,5 \times 10^6$ células MDA-MB-435 β 4. Se evaluó el crecimiento de tumor en ratones no tratados (A) y en ratones tratados con: 10 μ g/gr de VSV-G administrado IP (B), 1 μ g/gr de AntiMET-R IP (C), 10 μ g/gr de AntiMET-R IP (D) y 2 μ g/gr de AntiMET-R IS (E). Como se muestra en el diagrama (K), AntiMET-R inhibió el crecimiento de tumor en ratones desnudos injertados con células tumorales humanas. Se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica para anti humano fosfo-HGFR sobre secciones de tumor mostradas en el panel izquierdo. Estaba presente activación fuerte de HGFR tanto en ratones no tratados (F) como en ratones tratados con anticuerpo control (G). La administración de AntiMET-R dio como resultado la inhibición de HGFR que estaba en paralelo con la alteración de crecimiento de tumor. (L) Análisis de metástasis pulmonar. Se contaron las metástasis mediante observación microscópica de las secciones pulmonares después de tinción con hematoxilina/eosina. Era evidente

una reducción dependiente de la dosis del número de metástasis en los ratones tratados con AntiMET-R. (M-N) Evaluación de la vascularización de tumor. Se realizó tinción por inmunofluorescencia sobre secciones histológicas de tumor con un anticuerpo anti-ratón CD31. Se evaluaron el número y área de vasos mediante microscopía de fluorescencia. Como se muestra, tanto el número como el tamaño de vasos se redujeron en respuesta a tratamiento de AntiMETR.

5
10
15
- Figura 5. AntiMET-R induce regulación descendentes de HGFR. Células GTL16 (A) y MDA-MB-435 β 4 (B) se trataron con AntiMET-R durante los tiempos indicados. Cantidades iguales de lisados de células totales se procesaron para transferencia de Western y se sondaron con anti-HGFR (paneles superiores) o, como una carga control, con anticuerpos anti-Hsp70 (paneles inferiores). Como se muestra, AntiMET-R era capaz de inducir la regulación descendente de HGFR tanto en células que sobreexpresan (GTL16) como en células que expresan niveles normales de HGFR (MDA-MB-435 β 4). (C) Cuantificación citofluorométrica de HGFR sobre la superficie celular. Las células MDAMB- 435 β 4 se incubaron en medio solo (barras negras) o HGF (barras gris) o AntiMET-R (barras blancas). En los momentos indicados, se tiñeron células con Ab anti-extra HGFR (DO24). Como se muestra, AntiMET-R era capaz de reducir de manera eficaz la cantidad de HGFR de superficie con la reducción máxima después de 30 horas de tratamiento.

20
- Figura 6. La regulación descendentes dependiente de ligando e inducida por anticuerpo sigue rutas diferentes. (A) Células HeLa (panel superior) y GTL16 (panel inferior) se trataron previamente con o bien lactacistina (lact) o concanamicina (conc) o ambas durante 2 horas, antes de tratamiento con HGF o AntiMET-R. Regulación descendente de HGFR se evaluó sobre lisados de células totales. En la presencia de inhibidores de proteasomas, la regulación descendentes de HGFR inducida por ligando estaba alterada, mientras que la inducida por Ab no lo estaba. En este estado se acumuló en las células un fragmento de 60 Kd (flecha), detectable solamente por un Ab dirigido contra la parte intracelular (anti-intra Met). Además, sondando con anticuerpos anti-ubiquitina (B, panel superior) mostró que este fragmento se etiquetó con restos de ubiquitina, como se espera para una molécula sometida a la degradación proteasómica.

25
30
35
- Figura 7. AntiMET-R induce la escisión proteolítica de HGFR y el desprendimiento del dominio extracelular (ECTODOMINIO). (A) Células GTL16 se marcaron metabólicamente con ^{35}S Metionina y ^{35}S Cisteína y después se trataron con o bien HGF o AntiMET-R durante 4 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se inmunoprecipitaron con Ab anti-HGFR dirigido contra el dominio extracelular. Los geles se desarrollaron en condiciones no reductoras (panel superior) o reductoras (panel inferior). En la ausencia de agentes reductores las cadenas α y β de HGFR migran como un complejo, mientras las dos bandas se desarrollan de manera separada en la presencia de β -mercapto etanol. Como se muestra en la figura, AntiMET-R pero no HGF era capaz de inducir el desprendimiento del ectodominio de HGFR. (B) AntiMET-R induce el desprendimiento de ectodominio también en células endoteliales. Células HUVEC se expusieron al anticuerpo durante los tiempos indicados. Se recogieron los medios de cultivo y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo que reconoce la parte extracelular de la cadena β de HGFR. Transferencias de Western se sondaron con el mismo anti-extra HGFR. (C,D) El desprendimiento de HGFR es dependiente de la dosis y del tiempo. Células se estimularon con cantidad creciente de AntiMET-R (C) o durante tiempos diferentes (D). Se trataron medios de cultivo como en (B)

40
45
- Figura 8. La activación de la transducción de señal no se requiere para el desprendimiento de HGFR. Células Cos-7 se transfectaron con diferentes mutantes de HGFR y 48 horas después se trataron con AntiMET-R durante 4 horas. Cantidad igual de lisados de células totales y medio acondicionado se procesaron mediante transferencia de Western. Como se muestra, AntiMET-R era capaz de inducir la regulación descendente y desprendimiento de ectodominio de todos los mutantes de HGFR. HGFR KD = HGFR Quinasa muerta, que carece de actividad quinasa; HGFR Doble = mutante de HGFR que carecen de las 2 tirosinas reductoras 1349, 1356 y de este modo son incapaces de restablecer los transductores de señal; HGFR-GFP = mutante de HGFR donde la parte intracelular total se reemplazó por la secuencia de GFP.

- Figura 9. El ectodominio desprendido de HGFR se comporta como un "señuelo (Decoy)". Células pre-tratadas con AntiMET-R se estimularon con HGF o bien en la ausencia o en la presencia del ectodominio de HGFR (Met ecto) en el medio de cultivo. Como se muestra, el ectodominio de desprendimiento de HGFR alteró la activación de Akt y se comportó como un "señuelo (Decoy)".

50
55
- Figura 10. Células modificadas genéticamente mediante transferencia génica mediada por vector lentiviral expresan AntiMET-R. (A) Dibujo esquemático del vector lentiviral bidireccional (forma integrada) usado para expresar AntiMET-R; repeticiones terminales largas LTR: HIV-1; la región U3 se suprime en la posición -18 de la región R. SD: Donador de ajuste. SA: aceptor de ajuste. PoliA SV40: sitio de poliadenilación del virus 40 de simio. Cte: elemento de transporte constitutivo derivado del virus Mason-Pfizer de mono. P_{min}CMV: promotor mínimo derivado de CytoMegaloVirus. hPGK: promotor humano del gen Phosphoglycerato Quinasa. PRE: elemento regulador después de la transcripción del virus de la hepatitis de la marmota americana. FLAG Tag: secuencia que codifica el epítipo DYKDDDK repetido 3 veces. His Tag: secuencia que codifica 7 restos de Histidina. (B) análisis de transferencia de

Western de sobrenadantes sin cultivo (75 μ l cada muestra) recogidos de dos líneas celulares representativas transducidas con vector lentiviral que llevan ADNc de AntiMET-R. Se sometieron las muestras a SDS-PAGE en condición reductora y los filtros correspondientes se sondaron con anti-ratón Ig. (C) Tabla que reseña la cuantificación AntiMETR en los sobrenadantes de cultivo derivados de un panel de líneas celulares transducidas con el vector lentiviral que lleva los ADNc de AntiMET-R.

- Figura 11: El AntiMET-R recombinante se une con alta afinidad al dominio extracelular de Met. (A) análisis de transferencia de Western de lisados de células que contienen el receptor de MET inmunoprecipitado con el AntiMET-R derivado de diferentes fuentes (hibridoma o línea celular de carcinoma modificada por ingeniería genética). La inmunoprecipitación se realizó incubando Seph. Prot. G con los sobrenadantes de cultivos de células de 1: Hibridoma que produce MAb no relacionado; 2 Hibridoma que produce AntiMET-R MAb; 3: células MDA-MB 435 infectadas con vector lentiviral que lleva ADNc para AntiMET-R MAb 4: células MDAMB 435 no infectadas. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras y los filtros correspondientes se sondaron con un anticuerpo anti-cMet dirigido contra la cola c-Terminal del receptor. (B) Ensayo de unión del AntiMET-R y el AntiMET-R recombinante al dominio extracelular del receptor Met. Placa de 96 pocillos recubierta con dominio extracelular MET purificado unido al dominio Fc derivado de Ig Humana (100 ng/pocillo) se incubó con concentraciones crecientes de AntiMET-R purificado o AntiMET-R recombinante (desde 0 a 5,5 nM). La curva de unión se reveló usando un anticuerpo anti-ratón ligado a Ig-HRP. Para controlar la especificidad de unión los inventores realizaron el mismo ensayo usando pocillos recubiertos con Fc-Ron (una proteína quimera generada condensando el dominio Fc de Ig Humana al dominio extracelular del receptor Ron, una proteína que pertenece a la familia del receptor de MET).

- Figura 12: El AntiMET-R recombinante induce la escisión proteolítica de HGFR y el desprendimiento del dominio Extracelular (ECTODOMINIO). Células HCT-116, un carcinoma Colorrectal derivado de la línea celular, se incubaron en condición sin suero 24 horas con la cantidad indicada de AntiMET-R purificado (A) o AntiMET-R recombinante (B). Lisados de células totales (paneles superiores) y sobrenadantes de cultivo de células (paneles inferiores) se sometieron a SDS-PAGE seguido de transferencia de Western. La disminución de la forma de Met (p145) madura en las células y el correspondiente incremento del ectodominio de Met (p80) en los sobrenadantes de cultivo se controlaron soldando filtros con DL-21 anti-cMet mAb que reconoce un dominio localizado en la parte extracelular de la cadena β de Met.

- Figura 13: Transducción con el vector lentiviral que codifica el AntiMET-R inhibe el fenotipo transformado de células cancerosas *in vitro* e *in vivo*. (A) Ensayo de crecimiento independiente de anclaje. Células HCT-116 transducidas (AntiMET-R) o no (WT) con el vector lentiviral que codifica el AntiMET-R se sembraron en agar al 0,5 %. Células se mantuvieron después en medio complementado con FCS al 2 % + 80 ng /ml HGF. Colonias se puntuaron después de 14 días; se muestra sobre la parte superior de un pocillo; sobre la parte inferior el gráfico representa el número de colonias (calculado por triplicado). (B) Ensayo de invasión. Células HCT-116 transducidas (AntiMET-R) o no (WT) con el vector lentiviral que codifica el AntiMET-R se sembraron sobre una cámara Transwell recubierta con matrigel. La cámara inferior se cargó con medio FBS al 2 % + 80 ng/ml HGF. Después de 24 horas se puntuaron las células unidas a la parte inferior de los filtros. Las fotografías son muestras representativas de los filtros. (C) Latencia de tumor *in vivo*. Células HCT-116 transducidas (AntiMET-R) o no (WT) con el vector lentiviral que codifica el AntiMETR se inyectaron por vía subcutánea en el costado de ratones desnudos atímicos (3×10^6 células/ratón, $n = 6$ para cada grupo). Se evaluó la masa tumoral cada 2 días con un calibre. Los ratones se consideraron positivos para la presencia de tumor cuando la masa de tumor excedía de 15 mm^3 . (D) En el crecimiento de tumor *in vivo*. Células HCT-116 transducidas (AntiMET-R) o no (WT) con vector lentiviral que codifica el AntiMET-R se inyectaron por la subcutánea en el costado de ratones desnudos atímicos (3×10^6 células/ratón, $n = 6$ para cada grupo). La cinética de crecimiento de tumor se evaluó midiendo la masa tumoral con un calibre cada 3 días. El día 65 se sacrificaron todos los ratones.

- Figura 14: Distribución directa intra-tumor de vector lentiviral que codifica AntiMET-R inhibe el crecimiento de tumor. Células HCT-116 (4×10^6 células/ratón) se inyectaron por vía subcutánea en el costado de ratones desnudos atímicos. Cuando la masa de tumor estaba alrededor de 10 mm^3 partículas de vector lentiviral de tumores (1 μ g de p24 /ratón) se administraron por vía intratumoral el día 0 y el día 3. Un grupo (CTRL) recibió partículas de vector que codifican GFP, mientras el otro grupo recibió partículas vectores que codifica AntiMET-R (AntiMET-R). La cinética de crecimiento de tumor se evaluó midiendo la masa tumoral con un calibre cada 3 días.

- Figura 15: Mapa del plásmido que codifica Anti-MET-R.

- Figura 16: Mapa del plásmido que codifica Anti-MET-R FLAG-His.

- Figura 17: Dibujo esquemático de los dominios derivados de la parte extracelular del HGFR (ectodominio Met).

- Figura 18: AntiMET-R específicamente reconoce un epítipo localizado en la región IPT. Medio acondicionado de células MDAMB- 435 transducidas con partículas de vector lentiviral que codifica Decoy Met etiquetado con myc,

SEMA PSI etiquetado con myc y PSI IPT1-4 etiquetado con myc se inmunoprecipitaron con el anticuerpo antiMET-R y se detectaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-myc biotinilado (panel derecho). Cantidades iguales de medio acondicionado se cargaron como un control para expresión de proteína (panel izquierdo). CTRL: medio acondicionado de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral vacío. Decoy Met: medio acondicionado de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral que expresa el dominio extracelular de HGFR entero. PSI-IPT: medio acondicionado de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral que expresa los dominios PSI, IPT-1, IPT-2, IPT-3, IPT-4 del HGFR. SEMA-PSI: medio acondicionado de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral que expresa los dominios Sema y PSI del HGFR. A la derecha se muestran los pesos moleculares en KD.

10 - Figura 19: AntiMET-R reconoce un epítipo localizado en la región IPT-4. Los lisados celulares de células MDA-MB-435 transducidas con partículas de vector lentiviral que expresa regiones individuales de IPT-1, IPT-2, IPT-3, IPT-4, todas ellas etiquetadas con flag, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo antiMET-R y se detectaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-flag (panel izquierdo); como control para la expresión de proteína, cantidades similares de lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-flag y se detectaron mediante transferencia de Western usando el mismo anticuerpo anti-flag (panel derecho). CTRL: Lisado celular de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral vacío. IPT1: Lisado celular de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral que expresa la región de IPT-1 del HGFR. IPT2: Lisado celular de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral que expresa la región de IPT-2 del HGFR. IPT3: Lisado celular de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral que expresa la región de IPT-3 del HGFR. IPT4: Lisado celular de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral que expresa la región de IPT-4 del HGFR. A la derecha se muestran los pesos moleculares en KD.

15 - Figura 20: AntiMet-R específicamente tiñe el receptor de HGFR en células intactas. Panel A: Perfil de GTL-16 analizado por citometría de flujo con el anticuerpo antiMet-R. Línea delgada: GTL-16 incubadas con el anticuerpo de isotipo CTRL; Línea negra: GTL-16 incubadas con AntiMet-R. MFI: Intensidad de Fluorescencia Media. Panel C: análisis de inmunofluorescencia de células GTL-16 marcadas con el Anticuerpo antiMET-R revelado por una Ig de cabra anti-ratón Ig conjugadas con el fluorocromo Alexa Fluor 488. Panel B: células GTL-16 marcadas solamente con Ig anti-ratón / Alexa Fluor 488. (Aumento original, x 63)

20 - Figura 21: ácido nucleico (a) y secuencia de aminoácidos (b) de la cadena pesada de AntiMET-R. Las regiones CDR están subrayadas tanto en la secuencia de nucleótidos como en la de aminoácidos.

25 - Figura 22: ácido nucleico (a) y secuencia de aminoácidos (b) de la cadena ligera AntiMET-R. Las regiones CDR están subrayadas tanto en la secuencia de nucleótidos como en la de aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

El Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, codificado por el proto-oncogen de MET, es un receptor de la tirosina quinasa que, tras la activación, induce un espectro complejo de respuestas biológicas conocidas como "crecimiento invasivo" (8). Esto implica la inducción y coordinación de la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular. En condiciones fisiológicas, este programa de crecimiento invasivo desempeña un papel central en la organogénesis, durante el desarrollo embrionario pero, cuando se desencadena en el cáncer, contribuye a la progresión y metástasis de tumor (13).

La implicación de HGFR en tumores humanos ahora está firmemente establecida, ya que las mutaciones sin sentido de la línea germinal del gen MET son responsables de algunas formas de cáncer (9,10) y la activación inapropiada de HGFR se ha demostrado en la mayoría de los tipos de tumores sólidos, correlacionado a menudo con un pronóstico pobre (14). La alteración más frecuente en cánceres humanos es la sobreexpresión del receptor (15) que conduce a la dimerización y activación constitutiva del receptor, incluso en la ausencia de ligando (16). La expresión aumentada de HGFR se puede deber a (i) amplificación del gen, como en tumores colorrectales, donde MET confiere a las células neoplásicas una ventaja selectiva para la metástasis de hígado (11), (ii) transcripción potenciada, inducida por otros oncogenes, tales como Ras, Ret y Ets (17,18), (iii) transcripción activada por hipoxia, en este caso, la mayor cantidad de receptor hipersensibiliza las células a HGF y promueve la invasión de tumor (19).

Se usan actualmente dos estrategias en la práctica clínica con el fin de interferir con los receptores de tirosina quinasa (RTKs):

50 (i) tratamiento con pequeñas moléculas que inhiben la actividad de la tirosina quinasa; (ii) tratamiento con anticuerpos que interfieren con la activación del receptor.

La presente invención se dirige al uso en la terapia de tumor de un anticuerpo anti-HGFR, y en particular un anticuerpo monoclonal anti-cMet - llamado AntiMET-R - producido por la línea celular de hibridoma depositada por ICLC con número de acceso PD 05006, que sorprendentemente se encontró que induce la regulación descendente

del receptor.

En una realización, la presente invención implica el uso del anticuerpo monoclonal AntiMET-R para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores y metástasis en un paciente que sufre un tumor.

5 En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo antiMET-R para la fabricación de dispositivos de diagnóstico para la detección de células neoplásicas o bien in vivo o in vitro.

10 AntiMET-R es un anticuerpo monoclonal (mAb) específico para el dominio extracelular de HGFR (20). Este anticuerpo monoclonal no desencadena todos los efectos biológicos inducidos por el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (motilidad, proliferación, supervivencia celular, invasión, tubulogénesis y angiogénesis) sino que induce solamente motilidad. Además, regula de modo ascendente la expresión constitutiva de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa pero no es capaz de inducir y mantener la expresión de receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa durante tiempos prolongados de tiempo. Este mAb activa la fosforilación del receptor, que, siendo estrictamente dependiente de la bivalencia de mAb, requiera la dimerización del receptor.

15 La capacidad agonista de este anticuerpo no es suficiente - *per se* - para justificar su actividad terapéutica. De hecho, un anticuerpo monoclonal antiMET-R diferente (DO-24), que examinaron los inventores, no es capaz de inducir una regulación descendente del receptor eficaz y no promueve el desprendimiento de la parte extracelular del receptor.

20 AntiMET-R no evita la interacción de HGFR con HGF, pero promueve de manera eficaz la regulación descendente de HGFR como se muestra en Ejemplo 4 más abajo y se describe con referencia a la Figura 5. Esta interacción conduce a la inhibición de la transducción de la señal mediada por HGFR y en particular de la ruta Akt, que se conoce que está implicado en la respuesta anti-apoptótica.

25 Como sera evidente de los resultados descritos más abajo, los inventores demostraron que el tratamiento in vitro con AntiMET-R dio como resultado una alteración en la capacidad celular de crecer de una manera independiente del anclaje (véase Ejemplo 2 y Figura 2), una propiedad que requiere el escape de apoptosis debido a la carencia del anclaje. Además in vivo - como se describe en detalle en el Ejemplo 3 - en animales tratados con AntiMET-R, los presentes inventores han observado que los tumores muestran un aumento de tasa de la apoptosis, sin cambios importantes en la tasa de proliferación. Por otra parte, los inventores no han observado modificación de las propiedades del crecimiento celular en respuesta al anticuerpo, ni in vitro, ni in vivo, de acuerdo con la pérdida de efecto inhibitorio de AntiMET-R sobre la activación de la ruta de MAPK. Esta disociación de la capacidad de HGFR de activar diferentes rutas no es novedosa, ya se ha demostrado para diferentes mutantes de HGFR (21) y en respuesta a agonistas parciales de HGFR (22).

30 La regulación descendentes de HGFR inducida por anticuerpo implica el desprendimiento de la parte extracelular del receptor. El desprendimiento del ectodominio es un proceso en el que el dominio extracelular de las proteínas de membrana se libera proteolíticamente de la superficie celular, permitiendo de este modo que una célula cambie rápidamente su superficie en respuesta a estímulos ambientales y para producir reguladores solubles. Los presentes inventores muestran evidencia de esta actividad AntiMET-R en los Ejemplos 6 y 7.

35 En la presente solicitud los inventores producen evidencias - en particular en el Ejemplo 3 - que el anticuerpo antiMET-R es activo in vivo donde altera el crecimiento de tumor y formación espontánea de metástasis de células cancerosas injertadas en los ratones desnudos. Los experimentos sugieren que estos efectos están mediados por la acción del anticuerpo tanto en células cancerosas como en el microambiente. De hecho, las células endoteliales expresan HGFR (24) y los inventores han demostrado que antiMet-R induce el desprendimiento del HGFR también en este tipo de células (datos no mostrados). La neovascularización del tumor primario es un requerimiento absoluto para tanto el crecimiento como metástasis de tumor (23) y se ha establecido firmemente que HGF es un portante factor angiogénico (24). Además tras la activación de HGFR, se produce un incremento en la liberación del VEGF y otros factores angiogénicos (48-49-40). De este modo, el efecto sobre la vascularización del tumor también puede ser indirecto ya que la inhibición de la función de Met en las células tumorales puede revocar la liberación de tales factores del tumor. Los inventores de la presente invención han observado una reducción significativa de la neovascularización intratumoral, debido a la disminución del número de vasos que surgen del microambiente después de tratamiento con AntiMET-R.

40 Merece la pena hacer notar que la actividad de AntiMET-R sobre las células no impactó en la funcionalidad de diferentes órganos tales como bazo, médula ósea, hígado, corazón, hueso y riñón, que no mostraron alteraciones patológicas evidentes (datos no mostrados) después de largo tiempo de exposición al anticuerpo. De este modo, a pesar de reconocer HGF-R tanto en células normales como neoplásicas, el AntiMET-R muestra la capacidad para detectar la sobreexpresión de HGF-R y para inducir cambios en la viabilidad celular.

45 En conclusión, los resultados mostrados en el presente documento sugieren que la regulación descendente inducida

por HGFR es un mecanismo candidato para la inmunoterapia y el uso de AntiMET-R o sus fragmentos en una composición farmacéutica puede proporcionar una forma adicional en el tratamiento de tumores y prevención de metástasis en pacientes afectados por tumor.

5 De manera adicional, AntiMET-R se puede usar como herramienta de diagnóstico para detectar células neoplásicas o bien in vivo o in vitro, por ejemplo mediante etiquetado de AntiMET-R con etiquetas adecuadas.

AntiMET-R conforme con la presente invención se puede producir mediante procedimientos convencionales en animales o, preferiblemente, mediante técnicas de ingeniería genética.

10 El uso del anticuerpo monoclonal AntiMET-R de acuerdo con la presente invención pretende incluir también el uso de anticuerpos modificados por ingeniería genética o humanizados y anticuerpos etiquetados con marcadores de diagnóstico adecuados. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética o humanizados y procedimientos para su producción se conocen en la técnica. Véase, para una revisión (25).

15 El uso de AntiMET-R también incluye el uso de fragmentos que contiene la región de unión a epítipo de los mismos, tales como péptidos que contienen la región de unión a epítipo o Regiones Determinantes Complementarias (CDR), fragmentos Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ fragmentos. Los fragmentos convencionales son típicamente producidos por escisión proteolítica, pero también se pueden producir mediante síntesis química, tal como síntesis de fase líquida o sólida, así como mediante técnicas de ADN recombinante.

20 AntiMET-R y sus fragmentos se usan preferiblemente en composiciones farmacéuticas en la forma de proteína soluble, cuya administración se puede lograr mediante procedimientos convencionales de administración de fármaco. Administración de composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo AntiMET-R y/o sus fragmentos se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición se puede administrar en una solución acuosa que se inyecta o infunde en el paciente. La determinación de la dosis apropiada depende de un número de variables específicas del caso, incluyendo la edad y el peso del paciente e implica experimentación rutinaria dentro de la experiencia de los expertos en la técnica.

25 La presente invención implica la producción de un vector de ADN que comprende un promotor sintético obtenido uniendo un promotor de de núcleo mínimo (promotor minCMV) cadena arriba en una orientación opuesta al promotor eficaz del gen de Fosfoglicerato Quinasa humano y ADN que codifica al menos una parte del anticuerpo monoclonal AntiMET-R. Las secuencias de ADN comprendidas en el vector codifican la cadena ligera y/o pesada de AntiMET-R; las sustituciones conservadoras en las secuencias de ADN también están abarcadas por la presente invención así como las secuencias modificadas por la adición de secuencias de etiqueta ambas en el extremo 5' o 3' terminal. Las secuencias de nucleótido que codifican la cadena pesada y ligera de AntiMET-R se representan en la SEQ ID No.: 1 y la SEQ ID No.:2, respectivamente.

Además los inventores modificaron la cadena pesada mediante la adición de una secuencia de etiqueta al 3' de la cadena pesada de AntiMET-R (SEQ ID No.: 3). Esta secuencia permite la purificación del MAb usando una columna Nichel y se reconoce específicamente por anticuerpos anti-FLAG (SIGMA).

35 Aunque la producción de los vectores de ADN de la presente invención se puede llevar a cabo mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, la producción se ejemplifica en el Ejemplo 10.

40 En otra realización, la presente invención implica el uso de un vector de ADN que comprende ADN que codifica la región de unión a epítipo del anticuerpo monoclonal AntiMET-R para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumor y metástasis en un sujeto. La administración de los vectores de ADN de la presente invención se puede lograr usando procedimientos conocidos de terapia génica. Por ejemplo los mencionados en (10).

45 Una realización adicional de la presente invención implica un producto que comprende el anticuerpo AntiMET-R y/o sus fragmentos e inhibidores de quinasa como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia de tumor. Ejemplos de inhibidores de quinasa que se pueden usar de manera ventajosa en la presente invención son análogo de estaurosporina K252A (Calbiochem-Novabiochem Intl.; 36); PHA-665752 (3Z)-5-[(2,6-diclorobencil)sulfonil]-3-[(3,5-dimetil-4-[(2R)-2-(pirrolidin-1-ilmetil)pirrolidin-1-il]carbonil]-1H-pirrol-2-il)metilen]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (34); SU11274 [(3Z)-N-(3-clorofenil)-3-[(3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il)metilen]-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida] (37, 38, 35); SU11271 [(3Z)-5-(2,3-dihidro-1H-indol-1-ilsulfonil)-3-[(3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il)metilen]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona] (38); SU11606 [(3Z)-N-(3-clorofenil)-3-[(3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-ilpropil)-1H-pirrol-2-il)metilen]-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida] (38).

50 De hecho los inventores han observado que el mecanismo inhibidor activado por AntiMET-R no requiere actividad de la tirosina quinasa de HGFR. Esta característica representa una ventaja relevante en un planteamiento terapéutico. De hecho, en la práctica clínica es frecuente combinar fármacos diferentes con el fin de mejorar el efecto sobre la molécula diana. En el caso de HGFR, de este modo es posible combinar los inhibidores de quinasa con el

anticuerpo, permitiendo la acción contemporánea tanto sobre la activación como los niveles de HGFR. Esto es probable que potencie la eficacia terapéutica de la terapia diana en los tumores Metoverespressing, con el deseo de interferir tanto con el crecimiento de tumor como con la adquisición de un fenotipo metastático invasivo.

5 El anticuerpo AntiMET-R y su parte de fragmentos del producto de acuerdo con la presente invención se producen como se ha especificado anteriormente. Los inhibidores de quinasa a usar en la preparación combinada de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante la síntesis química convencional o técnicas de ingeniería genética.

La presente invención se describirá ahora en relación con algunas realizaciones preferidas a modo de ejemplos no limitantes.

10 Anticuerpos, inhibidores y otros reactivos.

El AntiMET-R anti-HGFR monoclonal lo describió originalmente Prat (20). Otros anticuerpos usados para Inmunoprecipitación y análisis de transferencia de Western son: anticuerpo anti-HGFRs D024 y DL21 (que reconoce el dominio extracelular de HGFR descrito en 20); anti-fosfotirosina PY20 (Laboratorios Transduction), anti-ubiquitina (Babco), anti-Hsp70 (Stressgen), anti-fosfo Akt (Ser473, Tecnología de señalización de células), anti-Akt (Santa Cruz Biotechnologies) anti-HGFR dominio intracelular (C12, Santa Cruz Biotechnologies). Se realizaron tinciones Inmunohistoquímicas con: anticuerpo anti humano fosfo-HGFR (Señalización de células) y anti-ratón CD31 (Pharmingen). Para los experimentos *in vitro* e *in vivo* se usó anticuerpo del virus de estomatitis antivésicular (VSV-G, Sigma) como un control. Lactacistina y concanamicina se compraron de Calbiochem.

Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de. AntiMET-R

20 La traducción de la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de AntiMET-R correspondiente a la SEQ ID No.: 1 y la figura 21a se reseña en la figura 21b y SEQ ID No:6.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes a las regiones CDR están subrayadas en las Figuras 21a y 21b; sus secuencias de aminoácidos son: CDR-H1: GYFTSYW (SEQ ID NO.:8); CDR-H2: INPSSGRT(SEQ ID NO.: 9); CDR-H3: ASRGY(SEQ ID NO.:10).

25 La traducción de la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de AntiMET-R correspondiente a la SEQ ID No.: 2 y la figura 22a se reseña en la figura 22b y en la SEQ ID NO.:7.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos correspondiente a las regiones CDR están subrayadas en las Figuras 22a t 22b; sus secuencias de aminoácidos son: CDR-L1: QSVDYDGGSY (SEQ ID NO.:11); CDR-L2: AAS (SEQ ID NO.: 12); CDR-L3: QQSYEDPLT (SEQ ID NO.:13).

30 Transfección transitoria de células 293T para la producción de Vectores Lentivirales.

Aproximadamente 24 horas antes de la transfección se sembraron $6,0 \times 10^6$ células 293T en una placa de 15 cm. 2 horas antes se cambió el medio de cultivo de la transfección añadiendo 22 ml de IMDM, complementado con FBS inactivado por calor (10 %), Penicilina (25U/ml), Estreptomina (25U/ml) y Glutamina (1 %). La mezcla de ADN de plásmido para transfección se preparó añadiendo: plásmido ENV (VSV-G), 9 Pg; plásmido de EMPAQUETAMIENTO pMDLg/pRRE 16,2 µg; plásmido REV, 6,25 µg; plásmido de VECTOR DE TRANSFERENCIA n° 330 o n° 331, 37,5 µg. La solución de plásmido se completó hasta un volumen final de 1125 µl con 0,1X TE/dH₂O (2:1). Se añadieron 125 µl de 2,5M CaCl₂ y se dejó a TA durante 5'. Después, se agitó por aparato Vórtex a velocidad completa, se añadieron 1250 µl de solución 2X HBS y que se añadió inmediatamente gota a gota al cultivo de células. El ADN de plásmido precipitado con CaPi se incubó durante 14 -16 horas, después el emdio, se reemplazó con uno reciente al que se añadió 1mM butirato de sodio (18 ml por placa). El sobrenadante de cultivo de células, que contenía partículas de vector, se recogió a las 30 - 36 horas después de cambiar el medio. Después de la recogida, los sobrenadantes se centrifugaron a 2500 RPM durante 10', se filtraron a través de 0,2 µm y se almacenaron a -80 °C.

Infección de células diana por sobrenadante de células que contiene vector Lentiviral.

45 Se sembraron 10^5 células con medio de cultivo reciente complementado con FBS al 10 %, glutamina. Para la infección se incubaron líneas celulares, en la presencia de polibreno 8 µg/ml, con sobrenadante que contenía partículas de vector lentiviral preparadas como se ha descrito anteriormente a concentración final de partículas de vector entre 10 y 150 ng /ml de HIV-1 Gag p24 equivalente (medido por ensayo ELISA). Después de 18 horas se cambió el medio y las células se dejaron crecer. Cuando el cultivo era 80 % confluyente, células se incubaron con medio sin suero y después de 72 horas se recogió sobrenadante que contenía AntiMET-R.

50

Ensayo de regulación descendentes de HGFR.

Células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bobino al 10 %. Se realizaron tratamientos con los anticuerpos y HGF en medio sin suero con 80 µg/ml y 80 ng/ml, respectivamente. Cuando está indicado, células se incubaron previamente durante 2 horas con o bien 10 µM lactacistina o 100 nM concanamina, antes de estimulación. Para el análisis de degradación de HGFR, células se lisaron en tampón LB (2 % SDS, 0,5 M Tris-HCl pH = 6,8) y se evaluó la concentración de proteína en lisados celulares con el Kit de Ensayo de Proteínas BCA (Pierce). Después, se analizaron las cantidades totales de proteínas por SDS-PAGE y transferencia de Western. Para los experimentos de inmunoprecipitación, se lisaron las células en tampón EB (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 % de glicerol, 1 % de Triton X- 100) en la presencia de inhibidores de proteasa 1 mM de ortovanadato de sodio. Después de inmunoprecipitación con los anticuerpos apropiados, se realizaron lavados de alta rigurosidad. Después las proteínas inmunoprecipitadas se procesaron para transferencia de Western de acuerdo con procedimientos convencionales. La detección final se realizó usando el sistema de detección ECL (Amersham).

Marcado y análisis metabólico de desprendimiento de HGFR.

Se privó a las células de suero durante 16 horas, se marcaron por pulsos con [³⁵S] metionina y [³⁵S] cisteína (100 µCi/ml, Amersham Corp.) durante 30 min. en medio DMEM sin metionina ni cisteína y después se trataron con bien AntiMET-R o VSV-G o HGF durante 4 horas. Se recogieron los medios acondicionados y se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpo extracelular anti-HGFR. Se separaron las proteínas inmunoprecipitadas por SDS-PAGE y se realizó autorrafiografía como se ha descrito previamente en (26).

Ensayos biológicos in vitro.

Para la evaluación de crecimiento independiente de anclaje, se trataron previamente GTL16 con o bien AntiMET-R o VSV-G en medio agotado durante 48 horas. Después se sembraron 1.500 células en DMEM 2 % FBS más 0,5 % de agar blando (SeaPlaque agarosa, BMA) en cada pocillo y se mantuvo en presencia de las cantidades indicadas de anticuerpos y HGF durante 10 días. Las colonias desarrolladas se visualizaron finalmente mediante tinción con tetrazolio (47). El ensayo de invasión se realizó en cámaras Transwell (Corning). Los filtros de policarbonato (8 µm de tamaño de poro) se revistieron con 15 µg/cm² de membrana de base Matrigel (Collaborative Research). El tratamiento de anticuerpo se realizó incubando previamente las células durante 24 horas antes de sembrar con 20 nM AntiMET-R o VSV-G. Después se sembraron 5x10⁴ células en la parte superior de los filtros y se incubaron en DMEM + 2 % FBS con 100 ng/ml de HGF que se añadió en la parte inferior de los pocillos de las cámaras. Después de 48 horas, células en la parte superior de los filtros se retiraron mecánicamente. Células que migraron a la parte inferior se fijaron, se tiñeron y se contaron. El índice de migración se obtuvo dividiendo el número de células migradas sobre la estimulación de HGF por las que no habían migrado.

Marcado in vitro del HGFR con AntiMet-R.

Para análisis de citometría de flujo, 10⁵ de células GTL-16 se desprendieron con PBS-EDTA 0,025 %, se lavaron con PBS y se incubaron con 50 µg/ml de anticuerpo antiMET-R o la misma cantidad de Ig de ratón de isotipo control durante 15' a TA. Después de 2 lavados con PBS, las células se incubaron con 15 µg/ml de Ig anti-ratón de cabra conjugado a FITC (Laboratorios de Inmunoinvestigación Jackson) durante 15' a TA. Después se lavaron las células, se volvieron a suspender en PBS-5 % BSA y se analizaron por citometría de flujo (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Células GTL-16 se fijaron en metanol:acetona (3:1) durante 5' sobre hielo después se bloquearon con suero de cabra al 2 % en PBS durante 30' a TA. Se añadió antiMet-R purificado a una concentración de 2,5 µg/ml en suero de cabra al 2 % PBS y se incubó 1 h a TA, que después de 3 lavados con PBS, se reveló el anticuerpo anti-HGFR unido con 4 µg/ml de Ig de anti ratón conjugado con el Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Análisis de las muestras se realizó con un microscopio de fluorescencia (DM-IRB, Leica Microsystems).

Experimentos in vivo.

Los experimentos in vivo se realizaron mediante inoculación por vía subcutánea o bien 1x10⁶ GTL16 o 2,5x10⁶ MDAMB-435β4 en el flanco posterior de ratones hembra de seis semanas de edad inmunodeficientes nu/nu sobre fondo Swiss CD1 (Laboratorios Charles River). Tras la aparición del tumor, ratones que llevan masas de tamaño comparable se seleccionaron y se inocularon o bien I.P. o I.S. (I.S. solamente en el caso de ratones inyectados con GTL16) dos veces a la semana con las cantidades indicadas de AntiMET-R y anti-VSV-G. Después de 8 semanas de tratamiento, se sacrificaron los ratones y se evaluó el peso de tumor. En los ratones inyectados con MDA-MB 435β4 los pulmones se analizaron para determinar la presencia de metástasis espontánea. La tinción inmunohistoquímica de tumores primarios para la evaluación de HGFR fosforilado se realizó sobre secciones de tumor embebidos en parafina de 5 µm usando un anticuerpo anti-fosfo-HGFR (señalización de células, 1:100). Se estableció el número de metástasis mediante observación microscópica de los pulmones después se realizó la tinción con hematoxilina/eosina de acuerdo con el protocolo Masson-Trichrome (Sigma) para investigación patológica

rutinaria. Evaluación de vascularización de tumor se realizó mediante inmunohistoquímica sobre muestras embebidas el compuesto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek) e inmediatamente se congeló a -80 °C. Para las tinciones inmunohistoquímicas se usó un anticuerpo anti-ratón CD31 monoclonal de rata (Pharmingen).

Evaluación de apoptosis.

- 5 La determinación morfológica de apoptosis se evaluó de acuerdo con los criterios de Kerr. Debido al gran número de células necróticas individuales y apoptosis inducida por isquemia cerca de focos necróticos, se consideró fiable para el recuento apoptótico solamente tejido al menos 1 HPF (Campo de Potencia Total = 0,63 mm) lejos de las áreas de necrosis. No se evaluaron los casos con necrosis tumoral masiva. Todos los casos se englobaron en una de las dos categorías: más o menos que 10 figuras apoptóticas /10 HPF.

10 Inhibición de proteasas

- Antes de la estimulación de anticuerpo las células se trataron durante 2 horas con los siguientes inhibidores: 4 mM amiloride (Sigma) para inhibir Uroquinasa; 5 mM 1,10-fenantrolina (Sigma) para inhibir ADAM y proteasas dependientes de Zn; 20 µg/ml de aprotinina y 100 µg/ml de leupeptina para inhibir serina y cisteína proteasas, 10 µg/ml de pepstatina A para inhibir proteasas ácidos (Calbiochem). PKC se inhibió mediante tratamiento de las células con 1 µM TPA durante 24 horas.

Procedimientos de selección

La invención proporciona ensayos para seleccionar compuestos de ensayo que modulan la expresión/función/actividad biológica del HGFR o inducir el desprendimiento del dominio extracelular de HGFR en presencia o ausencia de HGF u otros agonistas del receptor.

- 20 Un compuesto de ensayo se une a HGFR preferiblemente interactuando con la parte extracelular del receptor. Más preferiblemente, un compuesto de ensayo disminuye una actividad biológica mediada mediante HGFR en al menos aproximadamente el 10, preferiblemente aproximadamente el 50, más preferiblemente aproximadamente el 75, 90, o 100 % con relación al compuesto de ensayo.

- 25 Un compuesto de ensayo adicional preferiblemente regula la expresión de HGFR. Más preferiblemente, un compuesto de ensayo regula de modo descendente la transcripción de HGFR o proteína en al menos aproximadamente el 10, preferiblemente aproximadamente el 50, más preferiblemente aproximadamente el 75, 90, o 100 % con relación a la ausencia del compuesto de ensayo.

Compuestos de ensayo

- 30 Los compuestos de ensayo pueden ser agentes farmacológicos, péptidos o proteínas ya conocidos en la técnica o pueden ser compuestos que previamente no se sabía que tenían actividad farmacológica. Los compuestos de ensayo pueden ser de origen natural o diseñarse en el laboratorio. Se pueden aislar a partir de microorganismos, animales, o plantas, se pueden producir mediante técnicas recombinantes o sintetizarse mediante procedimientos químicos conocidos en la técnica. Si se desea, los compuestos de ensayo se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos procedimientos de genotecas de combinación conocidos en la técnica, que incluyen pero no se limitan a, genotecas biológicas, genotecas en fase sólida o en fase de solución que se pueden dirigir espacialmente, procedimientos de genotecas sintéticas que requieren deconvolución, el procedimiento de genoteca "one-bead one-compound" ("una-perla un-compuesto"), y procedimientos de genotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. El planteamiento de genoteca biológica se limita a genotecas de polipéptidos, mientras los otros cuatro planteamientos son aplicables a genotecas de polipéptidos, no péptidos oligómeros, o pequeñas moléculas de compuestos.

Ensayos de unión

- 45 Para los ensayos de unión, el compuesto de ensayo es preferiblemente una molécula que se une a la parte extracelular de HGFR, donde dicha molécula imita la actividad de AntiMet-R de manera que se evita la actividad biológica normal de HGFR. Ejemplos de tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos o moléculas de tipo péptido.

- 50 En los ensayos de unión, o bien el compuesto de ensayo o HGFR parte extracelular puede comprender una etiqueta detectable, tal como una etiqueta de radioisótopo, fluorescente, quimioluminiscente, o enzimática (por ejemplo, yodo radiomarcado, fósforo radiomarcado, fluoróforos o proteínas fluorescentes, luciferasa, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina). Después se puede llevar a cabo la detección de un compuesto de ensayo que se une al dominio extracelular de HGFR, por ejemplo, por recuento directo de radioemisión, por recuento de centelleo, o por determinación de la conversión de un sustrato apropiado a un producto detectable, donde HGFR o una parte de su dominio extracelular se une a un soporte o lo expresa una célula o se puede recobrar de acuerdo con los

procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ensayos funcionales

Los compuestos de ensayo se pueden ensayar para evaluar la capacidad para disminuir un efecto biológico de HGFR. Tales efectos biológicos se pueden determinar usando los ensayos funcionales descritos en la presente solicitud. Se denominan ensayo de crecimiento independiente de anclaje y ensayo de invasión (ambos descritos en detalle en los ejemplos 2 y 11) y la evaluación del fenotipo transformado in vivo (descritos en detalle en los ejemplos 3, 11, 12). De este modo, los ensayos funcionales se pueden llevar a cabo in vitro, usando cualquier línea celular que expresa HFGR o in vivo usando cualquier modelo animal en el que es posible estudiar el desarrollo de un tumor experimental o de origen natural que expresa el HGFR. Un compuesto de ensayo que disminuye una actividad biológica de HFGR en al menos aproximadamente el 10, preferiblemente aproximadamente el 50, más preferiblemente aproximadamente el 75, 90, o 100 % se identifica como un agente farmacológico potencial para la disminución de la actividad biológica de HGFR.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. El anticuerpo anti-cMet AntiMET-R altera la transducción de la señal de HGFR.

AntiMET-R es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular del receptor de HGFR donde reconoce un epítipo distinto del que está unido por el ligando. Este mAb se comporta como un agonista parcial, ya que no desencadena todos los efectos biológicos inducidos por el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (motilidad, proliferación, supervivencia celular, invasión, tubulogénesis y angiogénesis) sino que induce solamente motilidad. Además, regula de modo ascendente la expresión constitutiva de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa pero no es capaz de inducir y mantener la expresión del receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa durante períodos prolongados de tiempo. Este mAb activa la fosforilación del receptor, que, siendo estrictamente dependiente de la bivalencia de mAb, requiere la dimerización del receptor.

Para abordar la cuestión de si el anticuerpo antiMET-R puede representar una herramienta para interferir con la activación del receptor de HGFR en la sobreexpresión de tumores, los inventores primero analizaron su bioquímica y actividad biológica en células tumorales expuestas de manera crónica a un anticuerpo. Como un modelo, los inventores usaron células GTL16, derivadas de un carcinoma gástrico humano, donde se sobreexpresa HGFR y por lo tanto se oligomeriza y constitutivamente se activa (27). Figura 1A muestra una reducción significativa en la expresión de HGFR y fosforilación de tirosina.

Se evaluó después el efecto del anticuerpo sobre la transducción de la señal HGFR. Ya que HGFR se sabe que promueve un fuerte programa anti-apoptótico mediante estimulación de la activación de Akt, los inventores evaluaron el nivel de fosforilación de Akt tras tratamiento con AntiMET-R. Como se muestra en Figura 1B, la fosforilación de Akt se inhibió tanto en condición basal y en células estimuladas por HGF.

Otra importante ruta activada por HGFR es la ruta MAPK, conocida por estar implicada en la estimulación del crecimiento de células. Los inventores comprobaron el nivel de activación de MAPK en células tratadas con anticuerpo, pero no se observó inhibición significativa de esta ruta (datos no mostrados).

Ejemplo 2. AntiMET-R inhibe in vitro el fenotipo transformado de células cancerosas.

El efecto del anticuerpo sobre el crecimiento celular se determinó mediante medición de la capacidad de las células de crecer de manera dependiente e independiente del anclaje y para invadir las matrices extracelulares. Como se muestra en Figura 2A, no existe diferencia en la capacidad de las células de crecer en condiciones de dependencia de anclaje tras tratamiento de anticuerpo.

El crecimiento independiente de anclaje depende estrictamente de la capacidad de las células de superar la apoptosis debido a la carencia de anclaje, el llamado "anoikis"; esta propiedad se analiza mediante la evaluación de la capacidad de las células para desarrollarse en agar blando (28). Ya que muchas reseñas han mostrado que la activación de HGFR es capaz de conferir a las células esta propiedad, los inventores sembraron Células GTL16 en agar al 0,5 % y se mantuvieron en cultivo en presencia o ausencia de diferentes cantidades de AntiMETR o de un anticuerpo irrelevante de isotipo emparejado (VSV-G), como un control. Como se muestra en la Figura 2B, células VSV-G tratadas así como no tratadas eran capaces de formar numerosas colonias. De manera inversa, AntiMET-R inhibían notablemente el crecimiento de células cancerosas independientes de anclaje de una manera dependiente de la dosis. Es interesante indicar que las Células GTL16 eran capaces de formar numerosas colonias en ensayo de agar blando incluso en condición basal, debido a la activación constitutiva de HGFR, y que el anticuerpo redujo el fenotipo transformado de estas células tanto en la presencia como en la ausencia de HGF.

Para evaluar la capacidad del anticuerpo de interferir con la invasividad de las células, los inventores estudiaron MDA-MB-435 β 4, una línea celular de carcinoma de mama que, en respuesta a HGF, es capaz de invadir las

membranas de base reconstituidas (29). Como se muestra en la Figura 2C, el tratamiento *in vitro* de estas células con AntiMET-R dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de las propiedades de las propiedades invasivas en respuesta a HGF.

Ejemplo 3. AntiMET-R inhibe *in vivo* el fenotipo transformado

5 Para evaluar la actividad de AntiMET-R sobre el crecimiento de tumor *in vivo*, los inventores inocularon por vía subcutánea células GTL16 en el flanco posterior de ratones hembra nu/nu inmunodeficientes. Los animales se trataron dos veces a la semana con o bien AntiMET-R o VSV-G, administrado *in situ* (2 µg/gr). La terapia comenzó 1 semana después de trasplante, tras la aparición de tumores en el sitio de inyección: solamente los animales con tumores de tamaño comparable se trataron durante 4 semanas. Se controló el volumen de tumor durante todo el
10 tratamiento y se observó una disminución de crecimiento en los ratones tratados con AntiMET-R (Figura 3A). Después de tratamiento, los ratones se sometieron a autopsia y se escindieron y se pesaron los tumores. Como se muestra en la Figura 3B, en los ratones tratados con AntiMET-R, los tumores eran significativamente más pequeños que en los controles ($p < 0,05$). En estos tumores el nivel de activación de HGFR, mostrado por tinción con anticuerpos específicos contra la forma fosforilada del receptor, disminuyó (Figura 3C) mientras el porcentaje de
15 células apoptóticas aumentó significativamente (Figura 3D). Además los presentes inventores evaluaron en las secciones de tumor los números apoptóticos y mitóticos después de teñir con hematoxilina/eosina. Mientras la apoptosis aumentó significativamente en los tejidos tumorales obtenidos de ratones tratados con el AntiMET-R, el número de mitosis casi no estaba cambiado (datos no mostrados).

Los inventores realizaron el mismo tipo de experimentos también sobre células MDA-MB-435 β4, un sistema de
20 modelo para metástasis espontánea *in vivo* (29). Los animales se trataron dos veces a la semana con diferentes dosis de AntiMET-R o el anticuerpo control, se administraron o bien sistémicamente (1 µg/gr o 10 µg/gr por vía intraperitoneal) o en el tumor (2 µg/gr *in situ*). La terapia comenzó el día de trasplante y se llevó a cabo durante 8 semanas (el tiempo para que se exprese el potencial metastático). Después de tratamiento, ratones se sometieron a autopsia y se realizaron el análisis de tumores primarios y pulmones (el sitio privilegiado de metástasis para estas
25 células). Diferentes órganos (bazo, médula ósea, hígado, corazón hueso o riñón) también se examinaron para excluir los efectos tóxicos potenciales. El análisis macroscópico mostró que el tratamiento AntiMET-R dio como resultado la inhibición del crecimiento de la masa tumoral primaria (Figura 4A-E y K). La tinción inmunohistoquímica con anticuerpos que reconoce la forma fosforilada de tirosina de HGFR mostró, también en este caso, una reducción notable de la activación del receptor (Figura 4F-J). Además, el análisis microscópico de las secciones de pulmón
30 reveló que tanto la inyección intratumor como la administración sistémica de AntiMET-R evitaba la aparición de metástasis distante en el pulmón y en los órganos inspeccionados (Figura 4L).

Ya que muchos trabajos han mostrado que HGF es un potente factor angiogénico y que la señalización de HGFR contribuye a la angiogénesis de tumor, los inventores analizaron la vascularización del tumor tras el tratamiento con
35 AntiMET-R. En estos tumores los inventores encontraron una reducción significativa del número de vasos (que eran pocos y mayores en tamaño) y de sus ramas (Figura 4M, N). Los inventores de este modo concluyen que el efecto anti-tumor y anti-metastático observado del tratamiento era debido a la acción combinada del anticuerpo sobre el tumor y sobre los vasos que surgen del microambiente.

Ejemplo 4. AntiMET-R induce la regulación descendente de HGFR

Para estudiar el mecanismo mediante el cual AntiMET-R es capaz de interferir con la activación de HGFR, los
40 inventores trataron con AntiMET-R o con VSV-G, las células que sobre expresan HGFR; este caso parece que se observa frecuentemente en muchos tumores de origen natural. Como se muestra en la Figura 5A, los inventores observaron que la cantidad total de HGFR disminuía, de una manera dependiente del tiempo, tras el tratamiento con AntiMET-R pero no con VSV-G. Esto sugiere que el anticuerpo anti-cMet inducía específicamente la regulación descendente del receptor. Es interesante subrayar que en estas células, que sobreexpresan HGFR, HGF, el ligando,
45 era incapaz de inducir la regulación descendente del receptor (Figura 6, panel inferior).

Los inventores después verificaron si el anticuerpo antiMET-R puede desencadenar la regulación descendente del receptor también en células que expresan los niveles normales de HGFR. Como se muestra en figura 5B, panel izquierdo, también en estas células, AntiMET-R regulaba de modo descendente de manera eficaz HGFR.

La reducción inducida por anticuerpo de HGFR expuesta en la membrana celular también se evaluó mediante
50 análisis de FACS. El análisis citofluorimétrico mostró que el tratamiento con anticuerpo redujo la cantidad de HGFR expresado en la superficie celular con mayor eficacia que el propio HGF (Figura 5B, panel derecho). Se observó una reducción similar, en el mismo ensayo, también en Células GTL16 (no mostrado).

Ejemplo 5. Mecanismo molecular de regulación descendentes de HGFR inducida por AntiMET-R

La regulación descendente dependiente de ligando e inducida por anticuerpo puede seguir diferentes rutas. La

regulación descendente dependiente de ligando de RTK es un proceso de múltiples etapas que incluye internalización, ubiquitinilación, clasificación endosómica y finalmente defradación liposómica o proteasómica (30).

5 Para evaluar qué ruta de degradación está implicada en la regulación descendente de HGFR inducida por anticuerpo, los inventores bloquearon la actividad de o bien el lisosoma o el proteasoma con los inhibidores
 10 específicos concanamicina y lactacistina, respectivamente, antes de la estimulación por anticuerpo. Sorprendentemente, aunque la inhibición de la ruta proteosómica alteraba gravemente la degradación de HGFR inducida por ligando, no afectaba a la regulación descendente del receptor debida a tratamiento con AntiMET-R (Figura 6A, panel superior), indicando de este modo que el anticuerpo y el ligando promueven la regulación descendente de HGFR mediante diferentes mecanismos moleculares. Además, cuando la actividad del proteasoma se alteró, un fragmento de 60 Kd, apenas detectable en condición basal, se acumulaba en gran medida en células tras tratamiento con anticuerpo (Figura 6A, panel inferior). Este fragmento era detectable sobre Transferencias de Western solamente con un anticuerpo anti-intracelular HGFR y constaba del dominio citoplásmico del receptor. Además, como se esperaba para las moléculas encargadas de la degradación proteosómica, el fragmento de 60 Kd se etiquetó con restos de ubiquitina (Figura 6B).

15 Ya que el dominio extracelular (Ectodominio) del receptor no era detectable en los lisados celulares tras el tratamiento con AntiMET-R, los inventores verificaron si se liberaban al exterior de las células tras la escisión, un fenómeno conocido como "desprendimiento" (31). Para ensayar esta hipótesis los inventores buscaron la presencia del ectodominio de HGFR en medio de cultivo de células. Células se etiquetaron metabólicamente con radioactivas
 20 ³⁵S-Cisteína y ³⁵S-Metionina y después se trataron con o bien HGF o AntiMET-R durante 4 horas. Se recogieron los medios y se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HGFR que reconoce el dominio extracelular. Como se muestra en la Figura 7A, de los medios de cultivo de células marcadas metabólicamente, los inventores inmunoprecipitaron una banda que se desarrolla en condiciones no reductoras con un peso molecular aparente de 130 Kd (correspondiente al complejo de las cadenas $\alpha\beta$ extracelulares); cuando el gel se desarrolló en condición reductora, el complejo se resolvió en las dos bandas de 80 Kd (cadena β) y 45 Kd (cadena α). Mientras la estimulación de HGF no potenciaba este proceso, el desprendimiento del receptor aumentó notablemente tras la unión a anticuerpo. De acuerdo con los datos previos (15), una ligera cantidad de ectodominio de HGFR, se sabe que se libera de manera constitutiva en el ambiente extracelular. Es interesante resaltar que el desprendimiento de ectodominio inducido por anticuerpo se observó también en células que expresan los niveles normales de HGFR, tales como células endoteliales (Fig. 7B).

30 Mediante tratamiento de células con cantidad creciente de anticuerpo durante 4 horas los inventores observaron que el desprendimiento de HGFR mediado por anticuerpo era dependiente de la dosis (Figura 7C). Para analizar la cinética de desprendimiento de HGFR mediado por anticuerpo, los inventores estimularon las células con la misma cantidad de o bien AntiMET-R o VSV-G durante tiempos diferentes. Se detectaron niveles crecientes de ectodominio en el medio de células tratadas con AntiMET-R - pero no en VSV-, que muestran que el desprendimiento inducido por anticuerpo era específico y dependiente del tiempo (Figura 7D).

Ejemplo 6. Desprendimiento de HGFR inducido por anticuerpo tiene lugar en la superficie celular

Para ensayar si la endocitosis se requiere para el desprendimiento de HGFR los inventores usaron una línea celular establemente transfectada con una forma mutante de Dinamina (Dyn K44A), que se sabe que altera la endocitosis dependiente de clatrina como consecuencia de la expresión de la Dinamina mutante. Como se muestra en la Figura
 40 7D, el desprendimiento inducido por anticuerpo no se alteró en las células donde estaba inhibida la endocitosis dependiente de clatrina.

Las proteasas implicadas más comúnmente el desprendimiento de las proteínas de membrana que pertenecen a las secretasas α de la familia ADAM. En un intento para identificar la enzima responsable del desprendimiento de HGFR, el agente quelante de Zn 1,10-fenantrolinea, un inhibidor de los ADAM y proteasas dependientes de Zn, se
 45 añadió a las células antes de tratamiento con anticuerpo. En estas condiciones, el desprendimiento del receptor no estaba afectado (datos no mostrados), lo que muestran que la escisión proteolítica del ectodominio de HGFR no está mediada por la secretasa α sino por una proteasa independiente de Zn.

Ya que se sabe que HGFR regula de manera transcripcional los genes implicados en la transferencia de puntos, los inventores también comprobaron si una proteasa del sistema de coagulación puede ser responsable del
 50 desprendimiento del ectodominio. Sin embargo, el papel de los factores procoagulantes en este proceso se excluyó ya que su inhibición con aprotinina no alteró el desprendimiento del ectodominio de HGFR inducido por anticuerpo (datos no mostrados). Usando un panel de otros inhibidores (amilorida, pepstatina A, leupeptina) los inventores también excluyeron la implicación de otras hidrolasas conocidas, tal como uroquinasa, proteasas ácidas, serina y cisteína proteasas (datos no mostrados). Además, los inventores también probaron que el desprendimiento del ectodominio es independiente de la activación de PKCa, ya que la inhibición de esta enzima con alta dosis (1 μ M) y tratamiento prolongado (24 horas) con el éster de forbol TPA, no disminuía el desprendimiento del ectodominio (datos no mostrados).

Este conjunto de experimentos, todos realizados con los controles positivos apropiados, indica que la enzima responsable del desprendimiento del ectodominio de HGFR está fuera de la lista de proteasas obviamente implicadas en el desprendimiento del receptor.

Ejemplo 7. No se requiere la activación de HGFR para el desprendimiento inducido por anticuerpo.

5 Como reseñaron los inventores anteriormente un complejo trimérico que contiene Endofilina, CIN85 y Cbl media la regulación descendente dependiente de ligando de HGFR (32). Este complejo está reclutado al receptor tras la activación de HGFR y promueve la endocitosis, ubiquitinilación y degradación del receptor. Con el fin de verificar si la activación del receptor y transducción de la señal se requieren para la modulación descendente inducida por anticuerpo y desprendimiento, los inventores sugirieron la capacidad de AntiMETR de regular de modo descendente diversos mutantes de HGFR. Los inventores expresaron en las células COS-7 o bien HGFR de tipo salvaje o los siguientes mutantes: i) MET KD, que codifica un receptor "muerto" desprovisto de actividad de tirosina quinasa, debido a una sustitución Lys-Ala en el bolsillo de unión de ATP, ii) MET "doble", que codifica un HGFR que carece de tirosinas Y1349, Y1356 que reducen los transductores de señal, iii) MET-GFP, un mutante negativo dominante donde la secuencia que codifica el dominio intracelular entero del receptor se reemplazó por secuencias de GFP. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se trataron con AntiMETR durante 3 horas. Se analizaron los extractos celulares y los medios extracelulares por transferencia de Western. De manera inesperada, AntiMET-R era capaz de desencadenar la regulación descendente e inducir el desprendimiento de HGFR en todos los mutantes (Figura 8). Este experimento sugiere que la regulación descendente del receptor de HGFR inducida por anticuerpo no requiere la actividad quinasa del receptor ni el reclutamiento de los transductores citoplásmicos, y que el dominio entero intracelular es prescindible para el proceso. Esto además confirma que el anticuerpo y el ligando activan diferentes mecanismos reguladores descendentes.

Ejemplo 8. El ectodominio desprendido de HGFR se comporta como un "señuelo"

Ya que se ha mostrado que un dominio extracelular del HGFR modificado por ingeniería genética puede funcionar de manera eficaz como una molécula "señuelo" dominante negativa (33), los inventores ensayaron la capacidad del ectodominio desprendido en la inhibición de la señalización de HGFR. Las células tratadas previamente durante 72 horas con AntiMET-R o VSV-G se estimularon durante tiempos diferentes con HGF o bien en la presencia (Figura 9, bandas 4 - 6) o en la ausencia (bandas 7 - 9) de ectodominio de HGFR en el medio de cultivo. Como se muestra, en presencia de HGFR ectodominio, la fosforilación de Akt desencadenada por HGF estaba fuertemente alterada, apoyando de este modo la idea de que el fragmento desprendido, como señuelo (33), actúa tanto como un competidor para la unión a HGF como una molécula dominante negativa que interfiere con la activación de HGFR.

Ejemplo 9. El Anticuerpo DO-24 de antiMET-R agonista no induce el desprendimiento de ectodominio.

La capacidad agonista de este anticuerpo no es suficiente - *per se* - para justificar su actividad terapéutica. De hecho, un anticuerpo antiMET-R monoclonal (DO-24) diferente que los inventores han examinado no promueve el desprendimiento de la parte extracelular del receptor pero es capaz de activar completamente el receptor.

Ejemplo 10. Producción de AntiMET-R por medio de transferencia de genes mediante Vector Lentiviral.

Los inventores insertaron las secuencias de la cadena pesada y ligera de AntiMET-R en un vector lentiviral bi-direccional (51) (Fig. 10A, 15 y 16). Este vector lentiviral permite la expresión coordinada de dos ADN separados gracias a la presencia de un promotor sintético (ACCTGGGTT, SEQ ID No.:4) obteniendo juntando un promotor de núcleo mínimo (promotor minCMV) cadena arriba en una orientación opuesta al promotor de hMGK (51). Este promotor sintético es capaz de dirigir la actividad de transcripción en ambas direcciones. Colocando de este modo los dos ADNc que codifican el AntiMET-R, una cadena arriba en orientación no codificante (la cadena ligera) y otra cadena abajo en orientación codificante (la cadena pesada), es posible generar de manera coordinada dos ARNm independientes. Los inventores produjeron partículas de vector con transfección transitoria de células v como se ha descrito. Después, para modificar permanentemente el genoma de células diana, los inventores infectaron un panel de carcinoma derivado de líneas celulares con sobrenadante que contiene partículas de vector. Después de infección, a las células se les cultivó en medio sin suero y se incubaron durante 72 horas para recoger los sobrenadantes de cultivo de células. Se determinó la presencia de anticuerpo antiMET-R por análisis de transferencia de Western (Fig. 10B) y se hizo la cuantificación de AntiMET-R por ELISA (Fig. 10C). Todas las líneas celulares transducidas produjeron el Anticuerpo antiMET-R que se secretaba correctamente en el sobrenadante de cultivo. La producción del anticuerpo era variable, en el intervalo 0,2 - 6 µg/ml, dependiendo de la línea celular analizada. El AntiMET-R recombinante específicamente se controló por ensayo de inmunoprecipitación (Fig. 11A), mientras la afinidad de unión se valoró por ensayo ELISA (Fig. 11B). AntiMET-R recombinante era capaz de reconocer específicamente el receptor de MET con una afinidad en el mismo intervalo del obtenido por el AntiMET-R producido de manera convencional por el hibridoma. Además el AntiMET-R recombinante, como el AntiMET-R producido por el hibridoma, era capaz de inducir la escisión proteolítica de Met y el desprendimiento del dominio

Extra- Celular (Fig. 12).

Ejemplo 11. La transducción con vector lentiviral que codifica el AntiMET-R inhibe *in vitro* e *in vivo* el fenotipo transformado de células cancerosas.

5 Los inventores transdujeron células HCT-116 con el vector lentiviral que codifica AntiMET-R (25 ng p24/ml). Las células transducidas se ensayaron, en comparación con las células de tipo salvaje, para su fenotipo transformado, analizando el crecimiento independiente de anclaje y propiedades de invasión de tumorigénesis *in vitro* e *in vivo*. Para el crecimiento independiente de anclaje, los inventores sembraron células que producen células antiMET-R y de tipo salvaje como control en agar al 0,5 % y las colonias obtenidas después de 15 días de cultivo se puntuaron. Las células transducidas se inhibieron en su capacidad de crecimiento independiente de anclaje a medida que daban lugar a un número reducido de colonias, más pequeñas en tamaño comparadas con las colonias generadas con las células de tipo salvaje (Fig. 13A). Para ensayar la invasividad de las células, los inventores analizaron la capacidad las células para invadir las membranas de base reconstituidas. Como se muestra en la Fig. 13B, células transducidas mostraron una reducción de sus propiedades invasivas. Los inventores ensayaron también la tumorigénesis *in vivo* de las células transducidas con vector lentiviral que codifica el AntiMET-R inyectándolos por vía subcutánea en el flanco de ratones desnudos atímicos. Los datos mostrados en la Fig. 13C y D indicaron que las células transducidas se alteraron en sus propiedades de tumorigénesis *in vivo* ya que la latencia de tumor y crecimiento de tumor se inhibieron en comparación con las células de tipo salvaje.

Ejemplo 12: La administración dirigida intra-tumor del vector lentiviral que codifica AntiMET-R inhibe el crecimiento del tumor.

20 Para tener una prueba formal de la eficacia de transferencia del gen AntiMET-R, los inventores administraron partículas de vector lentiviral que llevan los ADNc que codifican el anticuerpo directamente en los tumores preformados obtenidos por inyección subcutánea de células HCT-116 en el flanco de ratones desnudos. Los tumores tratados con vectores que codifican el AntiMET-R mostraron una velocidad de crecimiento más lento en comparación con los tumores tratados con vector control (Fig. 14).

Ejemplo 13: Sitio de unión de AntiMET-R sobre el ectodominio Met.

Para mapear el epítipo reconocido por Anti-MET-R, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación usando diferentes dominios extra celulares del Receptor del Factor de Crecimiento de Hepatocitos (también conocido como ectodominio Met) (Fig. 17):

- 30 - señuelo Met (aminoácidos 1 - 932): es una proteína soluble recombinante correspondiente a la región entera extracelular de Met humano truncado antes del dominio transmembrana (Michieli et al. 2004);
- SEMA PSI (aminoácidos 1 - 562): es una forma truncada de Decoy Met que contiene el dominio SEMA (aminoácidos 1 - 515) (Stamos et al, 2004; Gherardi et al. 2004) y la región PSI (aminoácidos 516-562) (Kozlov et al. 2004).
- 35 - PSI IPT (aminoácidos 1 - 24; 516 - 932): es una forma truncada de Decoy Met que contiene la secuencia guía endógena (aminoácidos 1 - 24) unida a la región PSI (aminoácidos 516 - 562) y los cuatro dominios IPT (aminoácidos 563 - 932) (Bork et al, 1999; Gherardi et al., 2004).

Al extremo C de cada molécula se añadieron una etiqueta de polihistidina y una etiqueta de epítipo Myc.

40 La secuencia de Decoy Met se derivó de la secuencia codificada con el Número de Acceso del Banco de Genes X54559 (Giordano et al., 1991); esta secuencia corresponde a la transcripción principal del gen Met humano que codifica una proteína de tirosina quinasa que se procesa correctamente y se localiza en la membrana.

Otras publicaciones se refieren a la secuencia codificada con el Número de Acceso del Banco de Genes J02958 (Park et al., 1987); esta numeración corresponde a la transcripción secundaria alternativamente que contiene una inserción de 54 pares de bases en la posición desde el nucleótido 2264 al nucleótido 2318. Esta transcripción codifica una proteína de tirosina quinasa que no se procesa correctamente y no se localiza en la membrana (Rodríguez et al., 1991). De acuerdo con esta secuencia, la región extracelular de Met corresponde a aminoácidos 1 - 950 y el tercer dominio IPT (IPT3) contiene una inserción de 18 aminoácidos.

La Tabla 1 resume las posiciones de los diferentes dominios de Met de acuerdo con las secuencias X54559 y J02958.

Tabla 1

Ectodominios MET	Banco de genes X54559 (aa - aa)	Banco de genes J02958 (aa - aa)
Decoy Met	1 - 932	1 - 950
SENA PSI 1	1 - 562	1 - 562
PSI	1 - 24; 516 - 932	1 - 24; 516 - 950
IPT 1	563 - 656	563 - 656
IPT 2	657 - 741	657 - 741
IPT 3	742 - 838	742 - 856
IPT 4	839 - 932	857 - 950

5 Los ADNc para las moléculas modificadas por ingeniería genética se subclonan en el vector lentiviral pRRL.sin.PPT.CMV.Wpre (Follenzi et al., 2000); las partículas recombinantes lentivirales se produjeron a gran escala y se usaron para transducir líneas celulares de tumores humanos (Michieli et al., 2004).

10 Los medios acondicionados de células MDA-MB-435 transducidas con Decoy Met etiquetado con myc, SEMA PSI y PSI IPT se inmunoprecipitaron con el Anticuerpo antiMET-R y se detectaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo biotinilado anti-myc (Fig. 18, panel derecho). Cantidades iguales de medios acondicionados se cargaron como un control para la expresión de proteína (fig. 18, panel izquierdo), donde el control es un medio acondicionado de células MDA-MB-435 transducidas con un vector lentiviral vacío. Como se muestra en el panel derecho de la Figura 18, AntiMET-R es capaz de inmunoprecipitar Decoy Met y PSI-IPT pero no SEMA-PSI. Por lo tanto, reconocía un epítotope en la región IPT.

15 Para mapear más en detalle el epítotope reconocido por el anticuerpo AntiMET-R se realizaron experimentos de inmunoprecipitación usando dominios IPT (Bork et al., 1999). Cada IPT es una forma troncada de PSI-IPT que contiene la secuencia guía endógena (aminoácidos 1 - 24) fusionada a IPT 1 (aminoácidos 563 - 656) o IPT 2 (aminoácidos 657 - 741) o IPT 3 (aminoácidos 742 - 838) o IPT 4 (aminoácidos 839 - 932).

20 Una etiqueta de polihistidina y epítotope Flag se añadieron al extremo C de cada molécula. Los ADNc para las moléculas modificadas por ingeniería genética se subclonaron en el mismo vector lentiviral como se ha reseñado anteriormente y las partículas lentivirales recombinantes se usaron para translucir las líneas celulares de tumos humanas.

Todas estas proteínas recombinantes eran factores solubles, pero IPT 2 no se secretaba en el medio acondicionado de las células transducidas. Por esta razón los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron sobre lisados de células

25 Lisados celulares de células MDA-MB-435 transducidas con IPT individuales etiquetadas con flag se inmunoprecipitaron con el Anticuerpo antiMET-R y se detectaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-flag (Fig. 19, panel izquierdo); cantidades similares de lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-flag y se detectaron mediante transferencia de Western usando el mismo anticuerpo anti-flag, como control para la expresión de proteína (Fig. 19, panel derecho).

30 Como se muestra en el panel izquierdo, AntiMET-R es capaz de inmunoprecipitar IPT 4, pero ninguno de los otros tres dominios de IPT. AntiMET-R reconoce un epítotope contenido en el dominio IPT 4 de la región extracelular de MET.

Ejemplo 14: AntiMET-R reconocía el HGFR en células intactas tanto tanto en análisis de FACS como en análisis de inmunofluorescencia.

35 Las células GTL-16, una línea celular de carcinoma gástrico humano humano, se incubaron con el anticuerpo antiMet-R. El perfil de GTL- 16 analizado por citometría de flujo reveló que el antiMET-R era capaz de teñir específicamente las células que expresan el HGFR. De hecho la media de intensidad de fluorescencia en las células marcadas con el anticuerpo antiMET-R se incrementó respecto a células control (Fig. 20, panel A). Las células GTL-16 se incubaron también, después de fijación, con el anticuerpo antiMET-R para realizar un análisis de inmunofluorescencia. La tinción reveló un marcado específico sobre las superficies de las células correspondientes al receptor de MET (Fig. 20, paneles B,C).

Naturalmente, aunque el principio de la invención es el mismo, los detalles de construcción y las realizaciones pueden variar ampliamente con respecto a los que se han descrito e ilustrado solamente a modo de ejemplo, sin salirse del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones anexas.

BIBLIOGRAFÍA

5 1. Hudson, P. J. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* 11, 548 - 557.
 2. Hudson, P. J. & Souriau, C. (2003) *Nat. Med.* 9, 129 - 134.
 3. Gschwind, A., Fischer, O. M. & Ullrich, A. (2004) *Nat. Rev. Cancer* 4, 361 - 370.
 4. Cragg, M. S., French, R. R. & Glennie, M. J. (1999) *Curr. Opin. Immunol.* 11, 541 - 547.
 5. Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P. & Novotny, W. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 391 - 400.

10 6. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. & Ferguson, K. M. (2005) *Cancer Cell* 7, 301 - 311.
 7. Hynes, N. E. & Lane, H. A. (2005) *Nat. Rev. Cancer* 5, 341 - 354.
 8. Trusolino, L. & Comoglio, P. M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2, 289 - 300.
 9. Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M. et al. (1997) *Nat. Genet.* 16, 68 - 73.

15 10. Kim, I. J., Park, J. H., Kang, H. C., Shin, Y., Lim, S. B., Ku, J. L., Yang, H. K., Lee, K. U. & Park, J. G. (2003) *J. Med. Genet.* 40, e97.
 11. Di Renzo, M. F., Olivero, M., Giacomini, A., Porte, H., Chastre, E., Mirossay, L., Nordlinger, B., Bretti, S., Bottardi, S., Giordano, S. et al. (1995) *Clin. Cancer Res.* 1, 147 - 154.
 12. Corso, S., Comoglio, P. M. & Giordano, S. (2005) *Trends Mol. Med.* 11, 284-292.

20 13. Comoglio, P. M. & Trusolino, L. (2002) *J. Clin. Invest* 109, 857 - 862.
 14. Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C., Morrison, P. T. & Salgia, R. (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 41-59.
 15. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. & Vande Woude, G. F. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915 - 925.
 16. Kong-Beltran, M., Stamos, J. & Wickramasinghe, D. (2004) *Cancer Cell* 6, 75 - 84.

25 17. Ivan, M., Bond, J. A., Prat, M., Comoglio, P. M. & Wynford-Thomas, D. (1997) *Oncogene* 14, 2417 - 2423.
 18. Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Ando, M., Stella, M. C. & Comoglio, P. M. (1996) *Oncogene* 13, 1911 - 1917.
 19. Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S. & Comoglio, P. M. (2003) *Cancer Cell* 3, 347 - 361.

30 20. Prat, M., Crepaldi, T., Pennacchietti, S., Bussolino, F. & Comoglio, P. M. (1998) *J. Cell Sci.* 111 (Pt 2), 237-247.
 21. Giordano S, Maffe A, Williams TA, Artigiani S, Gual P, Bardelli A, Basilico C, Michieli, P., Comoglio PM. (2000), *FASEB J.*, 2, 399 - 406.
 22. Boccaccio C., Ando' M., Comoglio PM., (2002) *FASEB J* 1, 120 - 2.
 23. Folkman, J. (1971) *N. Engl. J. Med.* 285, 1182 - 1186.

35 24. Bussolino, F., Di Renzo, M. F., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffer, A. & Comoglio, P. M. (1992) *J. Cell Biol.* 119, 629 - 641.
 25. Clark M.(2000) *Imm. Today* 21 397-402.
 26. Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P. & Comoglio, P. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 5954 - 5962.

40 27. Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M. F., Cooper, C. S. & Comoglio, P. M. (1989) *Nature* 339, 155 - 156.

28. Frisch, S. M. & Francis, H. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 619 - 626.
29. Trusolino, L., Bertotti, A. & Comoglio, P. M. (2001) *Cell* 107, 643 - 654.
30. Di Fiore, P. P. & De Camilli, P. (2001) *Cell* 106, 1 - 4
31. Arribas, J. & Borroto, A. (2002) *Chem. Rev.* 102, 4627 - 4638.
- 5 32. Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S., Comoglio, P. M., Migone, N. & Giordano, S. (2002) *Nature* 416, 187 - 190.
33. Michieli, P., Mazzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L. & Comoglio, P. M. (2004) *Cancer Cell* 6, 61 - 73.
- 10 34. 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. (2003) *Cancer Res.* Nov 1; 63 (21) :7345 - 55.
35. Berthou S, Aebersold DM, Schmidt LS, Stroka D, Heigl C, Streit B, Stalder D, Gruber G, Liang C, Howlett AR, Candinas D, Greiner RH, Lipson KE, Zimmer Y. (2004) *Oncogene* Jul 8;23 (31):5387 - 93.
36. Morotti A, Mila S, Accornero P, Tagliabue E, Ponzetto C. (2002) *Oncogene* Jul 25; 21 (32) : 4885 - 93.
- 15 37. Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan LA, Shirazian S, Liang C, Podar K, Christensen JG, Salgia R. (2003) *Cancer Res.* Sep 1; 63 (17) :5462 - 9.
38. Wang X, Le P, Liang C, Chan J, Kiewlich D, Miller T, Harris D, Sun L, Rice A, Vasile S, Blake RA, Howlett AR, Patel N, McMahon G, Lipson KE. (2003) *Mol Cancer Ther.* Nov;2 (11) :1085 - 92.
39. Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann C, (2004) *EMBO J*; 23: 2325 - 2335.
40. Gherardi E, Love CA, Esnouf RM, Jones EY, (2004) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14: 669 - 678.
- 20 41. Kozlov G, Perreault A, Schrag JD, Park M, Cygler M, Gehring K, Ekiel I, (2004) *Biochem Biophys Res Commun.*; 321(1):234 - 40.
42. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B, (1999) *Trends Biochem Sci.*; 24 (7): 261 - 3.
43. Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM, (1991) *J. Biol. Chem.*; 266: 19558 - 19564.
44. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G, (1987) *PNAS*; 84:6379 - 6383.
- 25 45. Rodrigues GA, Naujokas MA, Prak M, (1991) *Mol. Cell Biol.*; 11:2962 - 2970.
46. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L, (2000) *Nat. Genet.*; 25:217 - 222.
47. Schaeffer W.I., and Friend K (1976) *Cancer lett.* ; 1: 259-262.
48. Senguptas, Gherardi E, Sellers LA, Wood JM, Sasisekharan R, Fan TP (2003). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 69 - 75
- 30 49. Worden B, Yang XP, Lee TL, Bagain L, Yeh NT, Cohen JG, Van Waes C, Chen Z. (2005) *Cancer Res.*; 65: 7071 - 80.
50. Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 100:12718 - 23.
51. Amendola M, Venneri MA, Biffi A, Vigna E, Naldini L. (2005) *Nature Biotech.* 23: 108 - 116.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Università degli Studi di Torino

<120> Anticuerpo monoclonal Anti-Met, sus fragmentos y vectores para el tratamiento de tumores y productos correspondientes

5 <130> BWO8034-CF

<150> EP06101345.5

<151> 2006-02-06

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1

<211> 1386

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cadena pesada de AntiMET-R

<400> 1

ES 2 368 864 T3

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccactcccag 60
gtccaacctgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct 180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac 240
gagaaatcca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat ctccaccac agcctacatg 300
caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggctctatt actgtgcaag taggggctac 360
lgyggccaag gcaccacclcl cacagclclcc lcagccaaaa caacagcccc alcggclclcl 420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaacacaact ggctcctcgg tgaacttagg atgcctggtc 480
aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtggc 540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca cctcagcag ctcagtgact 600
gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc 660
agcaccaagg tggacaagaa aatcgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca 720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tottcatctt cctccaaag 780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg 840
agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900
gctcagacac aaaccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc 960
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa 1020
gacctcccag cgcctatcga gagaaccatc tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca 1080
caggatatatg tcttgcctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140
tgcatggcca cagacttcat gccgaagac atttacgtgg agtggacca caacgggaaa 1200
acagagctaa actacaagaa cacgaacca gtccctggact ctgatggctc ttacttcatg 1260
tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtggaaa gzaatagcta ctctgttca 1320
gtggtcacg agggctctgca caacaccac acgactaaga gcttctccc gactccgggt 1380
aatga 1386

<210> 2

<211> 717

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de AntiMET-R

<400> 2

ES 2 368 864 T3

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60
gacattg-gc tgaccaate tccagettct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120
atctcctgca aggccagcca aag-gttgat tatgatgggtg gtagttatat gagttggttc 180
caacagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgcatccaa tctagaatct 240
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat 300
cctqtqqaqg aqgaqatqt tqcaacctat tactqtcaqc aaagtatatga qgatccqctc 360
acgttcgggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
aacaact-ct accccaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
aatggcg-cc tgaacagttg gac-gatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
agcacc-ca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

<210> 3

<211> 1473

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de Anti-MET-R con una secuencia etiqueta al extremo 3'

<400> 3

ES 2 368 864 T3

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag 60
gtccaacgc agcagcctgg gacgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct 180
ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca ggggtcgtac taactacaac 240
gagaaatca agaaccaggt cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg 300
caactcagca acctgacatc tgaggactct ggggtctatt actgtgcaag taggggctac 360
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat 420
ccactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc 480
aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtggc 540
gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca cctcagcag ctcagtgact 600
glaaccctga gcaacclygc cagccagctc alcacclgca alglygccc cccygcayc 660
agcaccaagg tggacaagaa aatcgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca 720
tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tottcatctt cctccaaag 780
atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg 840
agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900
gctcagacac aaaccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc 960
cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa 1020
gacctcccag cgcctatcga gagaaccatc tcaaaacca aagggtcagt aagagctcca 1080
caggtatatg tcttgctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140
tgcatggca cagacttcat gccgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa 1200
acagagcna actacaagaa cacgaacca gtcttgact ctgatggttc ttacttcatg 1260
tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtgaaa gaaatagcta ctctgttca 1320
gtggtccacg agggctctga caacaccac acgactaaga gcttctccc gactccgggt 1380
aaagctagct ctgactaaa ggacgacgat gacaagagcg attacaaaga cgatgagat 1440
aagctgcagc atcaccacca tcaaccat tga 1473

<210> 4

<211> 9

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> promotor sintético - cadena arriba

<400> 4

acctgggtt 9

<210> 5

5 <211> 13

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> promotor sintético - cadena abajo

10 <400> 5

attggttgg tgg 13

<210> 6

<211> 461

<212> ?RT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de AntiMPT-R

<400> 6

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
1 5 10 15

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

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

Thr Ser Tyr Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

20

ES 2 368 864 T3

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Asn Lys Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Asn Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
 130 135 140
 Val Cys Gly Asn Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
 180 185 190
 Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 195 200 205
 Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val
 210 215 220
 Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
 245 250 255
 Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile
 260 265 270
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
 275 280 285
 Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 290 295 300
 Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
 325 330 335
 Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
 340 345 350
 Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro
 355 360 365
 Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr
 370 375 380
 Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys
 385 390 395 400
 Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415
 Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
 420 425 430
 Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
 435 440 445

ES 2 368 864 T3

His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 7

<211> 238

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de AntiMET-R

<400> 7

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr Met Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

ES 2 368 864 T3

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cadena pesada CDR-H1 de AntiMET-R

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
1 5

10 <210> 9

<211> 8

<212> ?RT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cadena pesada CDR-H2 AntiMET-R

<400> 9

Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr
1 5

<210> 10

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR-H3 Anti-MET-R

<400> 10

Ala Ser Arg Gly Tyr
1 5

25

<210> 11

<211> 10

<212> ?RT

<213> Artificial

ES 2 368 864 T3

<220>

<223> Cadena ligera CDR-L1 de AntiMET-R

<400> 11

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Gly Ser Tyr
1 5 10

5 <210> 12

<211> 3

<212> ?RT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera CDR-L2 de AntiMET-R

<400> 12

Ala Ala Ser
1

<210> 13

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena ligera CDR-L3 de AntiMET-R

<400> 13

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Leu Thr
1 5

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de

i) el anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R,

5 ii) un fragmento de (i) que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.: 10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 y CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13, y/o

10 iii) un anticuerpo modificado por ingeniería genética que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.:10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 and CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13

para la producción de un medicamento para el tratamiento de tumor y/o metástasis en un paciente que padece un tumor, en el que dicho anticuerpo AntiMET-R lo produce la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho anticuerpo, dicho fragmento y/o dicho anticuerpo modificado por ingeniería genética están en la forma de proteína soluble.

15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho anticuerpo y/o dicho anticuerpo modificado por ingeniería genética están producidos por un procedimiento seleccionado entre el grupo que consta de técnica de ADN recombinante, síntesis en fase sólida, síntesis en fase líquida.

20 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho fragmento se selecciona entre el grupo que consta de Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv, y un péptido que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.: 10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 y CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13.

25 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho fragmento está producido por un procedimiento seleccionado entre el grupo que consta de escisión proteolítica de dicho anticuerpo, técnica de ADN recombinante, síntesis en fase sólida, síntesis en fase líquida

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho medicamento es para la administración por inyección o por infusión.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho tumor se selecciona entre tumor colorrectal y tumor de hígado.

30 8. Uso de a secuencia de nucleótidos que codifica

i) el anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R,

ii) un fragmento de (i) que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.: 10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 y CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13 y/o

35 iii) un anticuerpo modificado por ingeniería genética que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.:10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 and CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13

40 para la producción de un medicamento para el tratamiento de tumor y/o metástasis en un paciente que padece un tumor, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R lo produce la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** la secuencia de nucleótidos comprende al menos:

i) SEQ ID NO.:1 y la SEQ ID NO.:2,

45 ii) una secuencia de nucleótidos que corresponde a la SEQ ID NO.:1 y la SEQ ID NO.:2, en el que están presentes una o más sustituciones silenciosas.

10. Uso de un vector que comprende al menos una secuencia de nucleótidos que codifica

- i) el anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R,
- ii) un fragmento de (i) que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.: 10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 y CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13 y/o
- 5 iii) un anticuerpo modificado por ingeniería genética que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.:10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 and CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13, en el que el anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R lo produce la línea celular de hibridoma ICLC PD 05006,
- 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento of tumor y/o metástasis en un sujeto que padece un tumor.
- 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque** dicho vector comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:
- i) SEQ ID NO.:1 y la SEQ ID NO.:2,
- 15 ii) una secuencia de nucleótidos que corresponde a la SEQ ID NO.:1 y la SEQ ID NO.:2, en la que están presentes una o más sustituciones silenciosas.
- 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque** dicho vector está en la forma de una partícula.
- 13. Producto que contiene**
- i) el anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R,
- 20 ii) un fragmento of (i) que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO. 10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 and CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13 y/o
- 25 iii) un anticuerpo modificado por ingeniería genética que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.:10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID NO.:12 y CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13
- y al menos un inhibidor de quinasa como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento of tumores y/o metástasis, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R lo produce la
- 30 línea celular de hibridoma ICLC PD 05006.
- 14. Producto de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque** dicho anticuerpo y/o dicho al menos un fragmento del mismo están en la forma de soluble proteína.
- 15. Producto de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque** dicho anticuerpo y/o dicho anticuerpo modificado por ingeniería genética se producen por un procedimiento seleccionado entre el grupo que consta de:
- 35 técnica de ADN recombinante, síntesis en fase sólida, síntesis en fase líquida.
- 16. Producto de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque** dicho fragmento se selecciona entre el grupo que consta de Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv, péptido que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal anti-cMet AntiMET-R, en el que CDR-H1 es la SEQ ID NO.:8, CDR-H2 es la SEQ ID NO.:9, CDR-H3 es la SEQ ID NO.:10, CDR-L1 es la SEQ ID NO.:11, CDR-L2 es la SEQ ID
- 40 NO.:12 y CDR-L3 es la SEQ ID NO.:13.
- 17. Producto de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque** dicho fragmento se produce por un procedimiento seleccionado entre el grupo que consta de escisión proteolítica de dicho anticuerpo, técnica de ADN recombinante, síntesis en fase sólida o síntesis en fase líquida.
- 18. Producto de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque** dicho al menos un inhibidor de quinasa se selecciona entre el grupo que consta de análogo de estaurosporina K252A; (3Z)-5-[(2,6-diclorobencil)sulfonil]-3-[(3,5-dimetil-4-[(2R)-2-(pirrolidin-1-ilmetil)pirrolidin-1-il]carbonil]-1H-pirrol-2-il)metilen]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona; [(3Z)-N-(3-clorofenil)-3-[(3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il)metilen]-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida]; [(3Z)-5-(2,3-dihidro-1H-indol-1-ilsulfonil)-3-[(3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il)metilen]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona]; [(3Z)-N-(3-clorofenil)-3-[(3,5-dimetil-4-(3-morpholin-4-ilpropil)-1H-pirrol-2-

il]metilen}-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida].

19. Producto de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** dicho producto es para la administración por inyección o por infusión.

Fig. 1

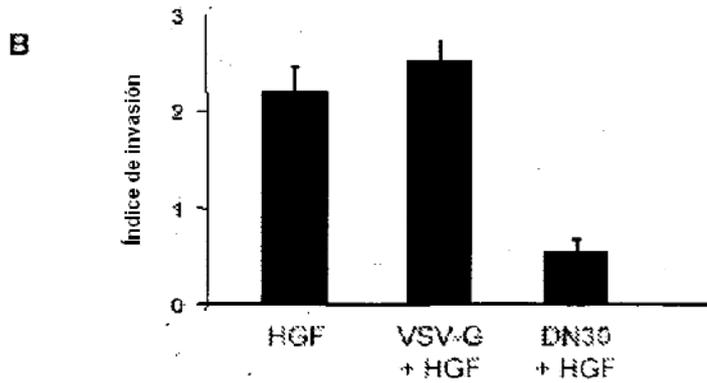
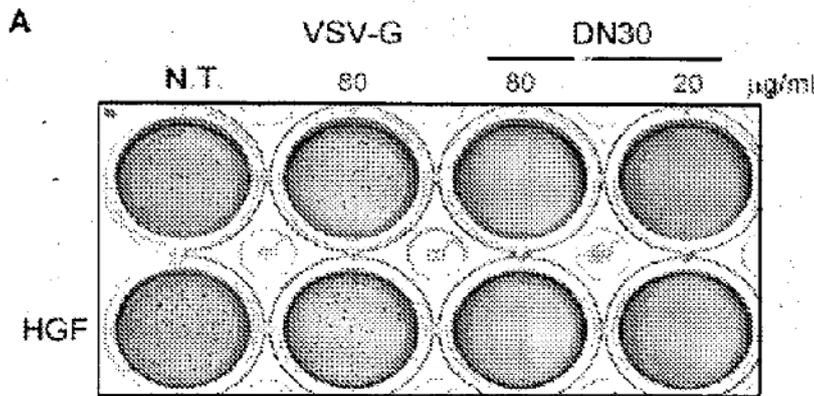
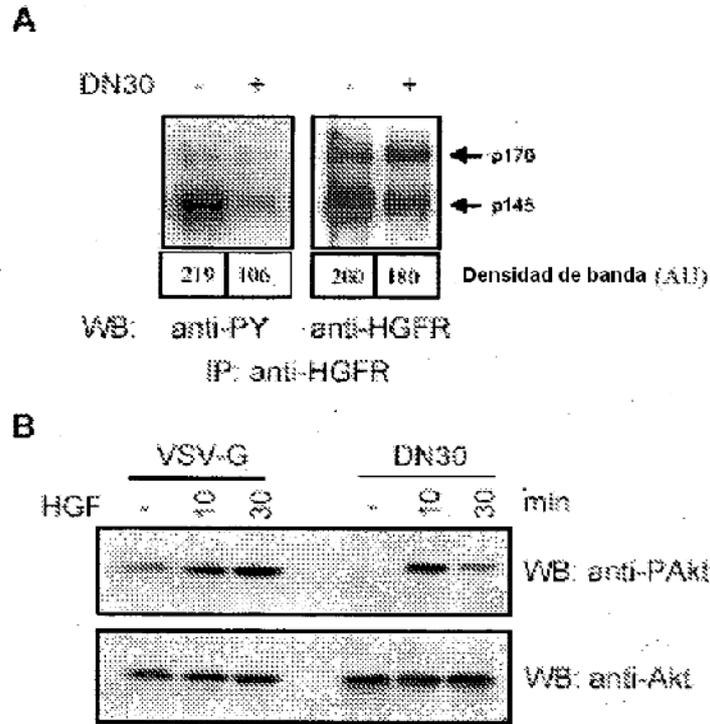


Fig. 2

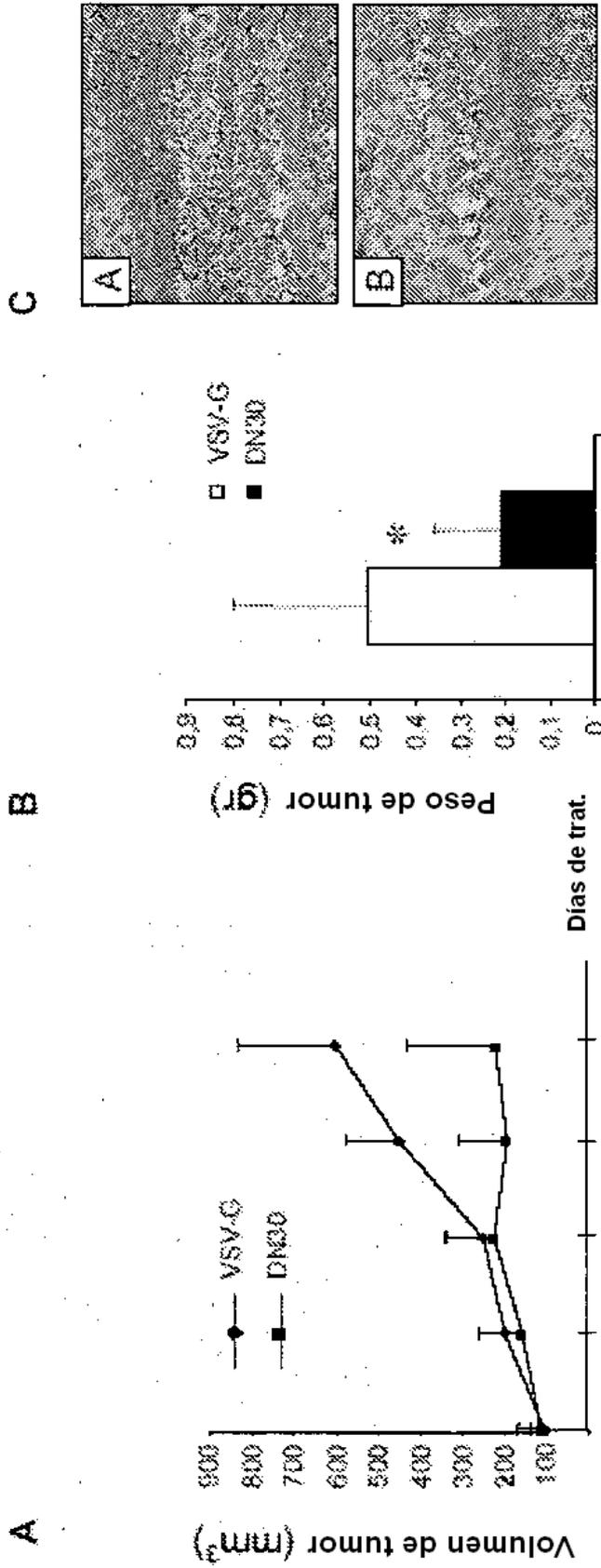


Fig. 3

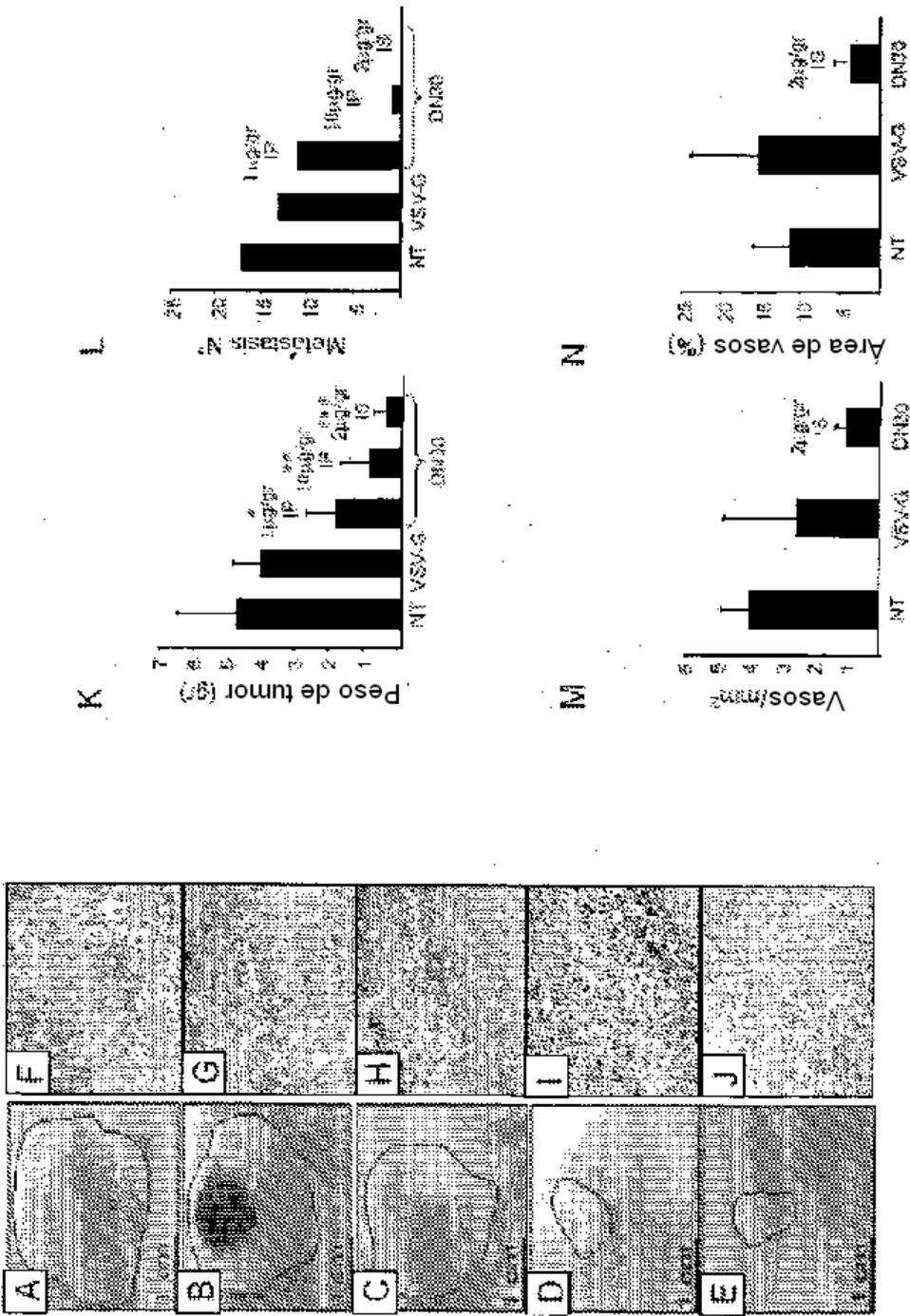


Fig. 4

Fig. 5

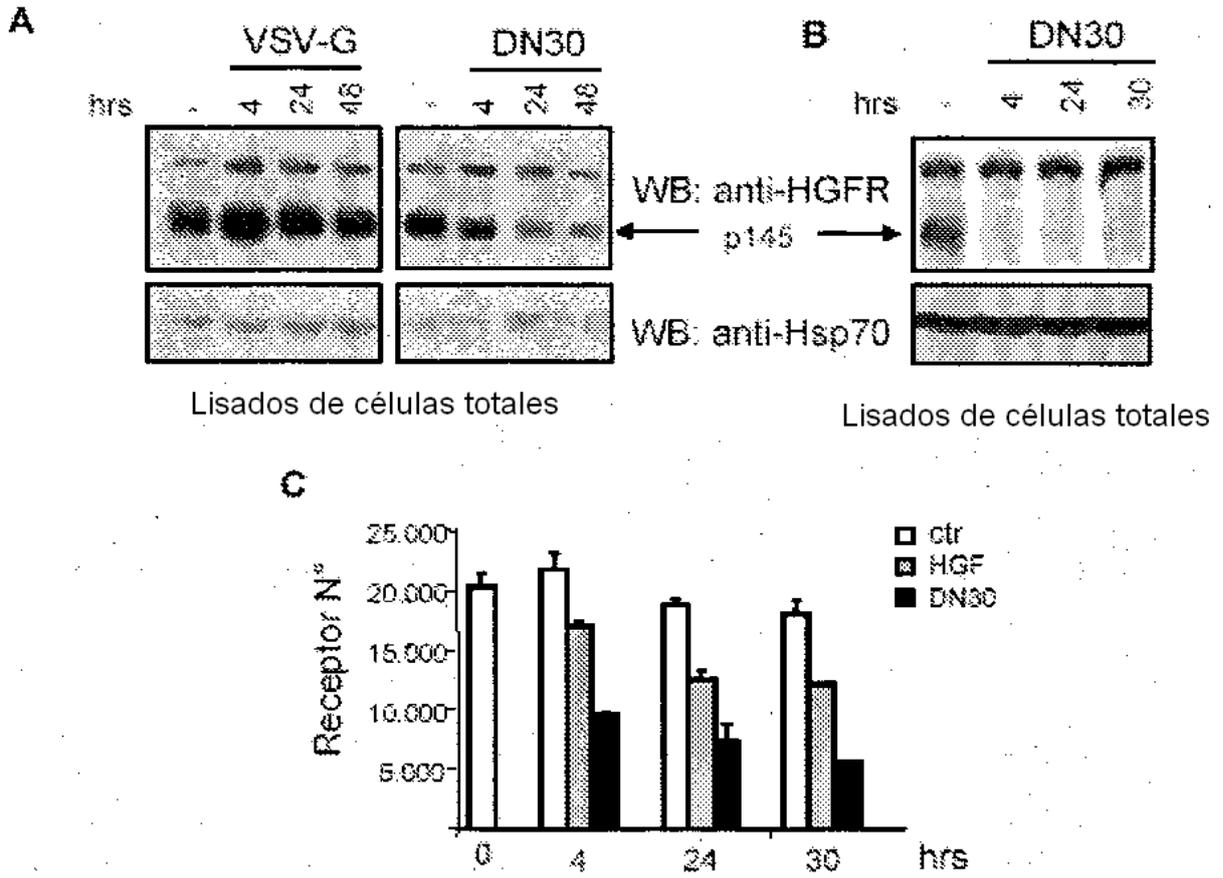


Fig. 6

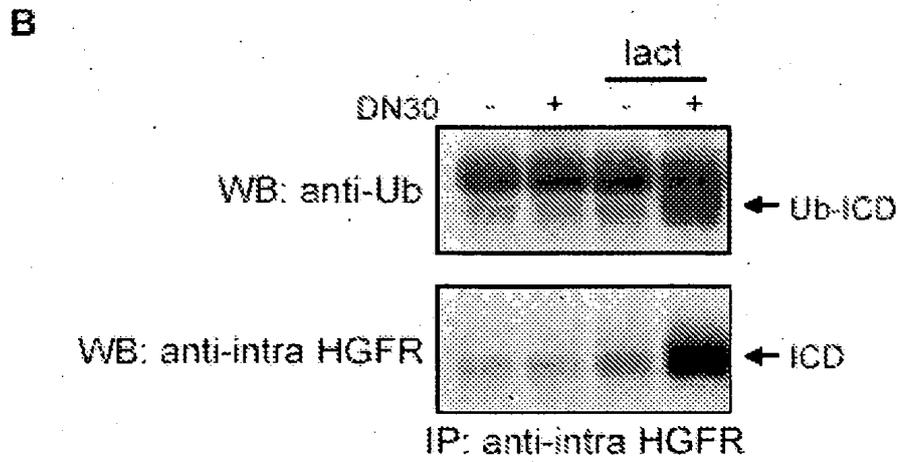
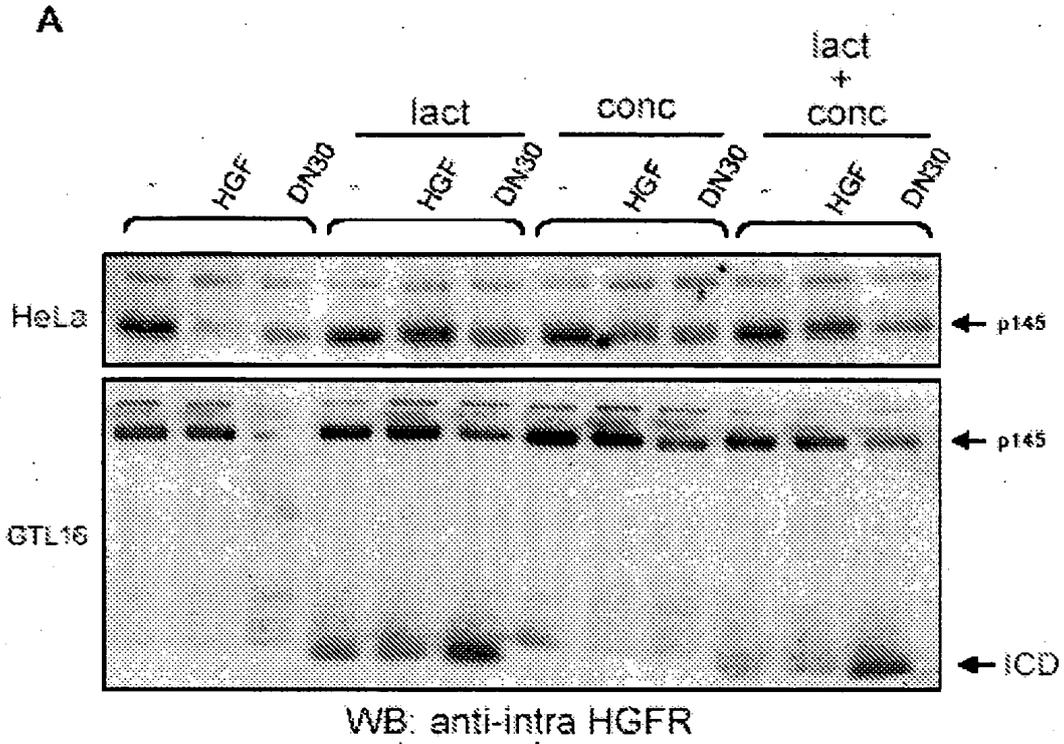


Fig. 7

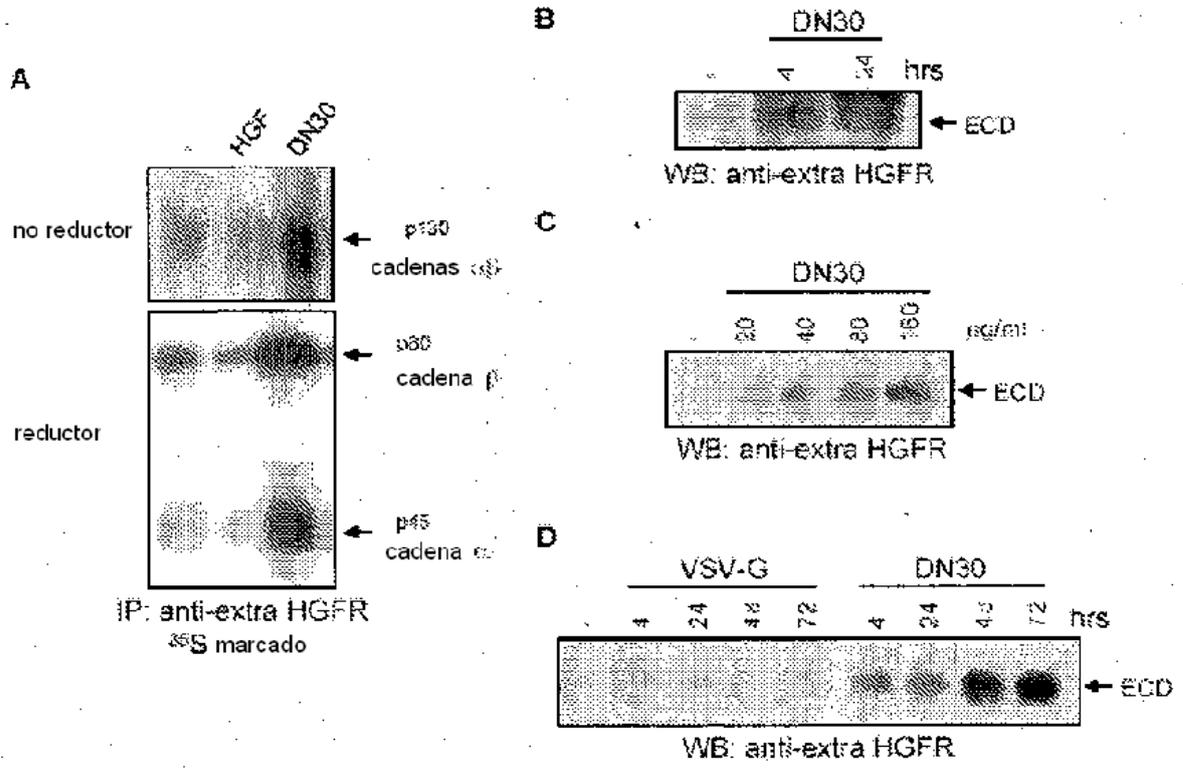


Fig. 8

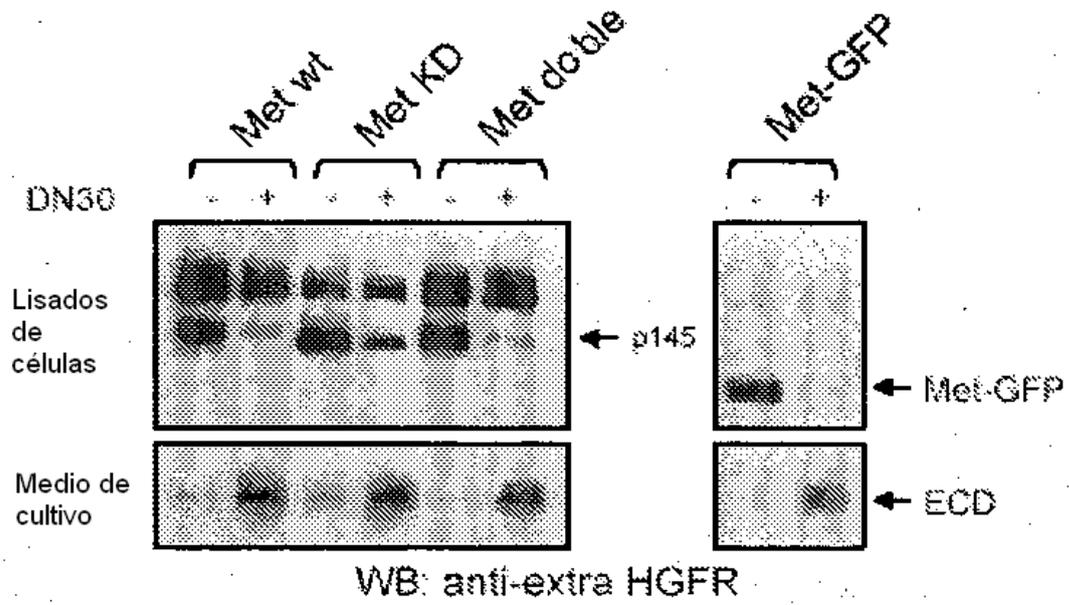
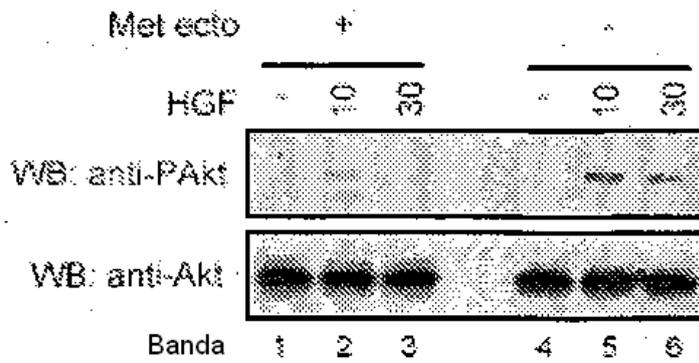


Fig. 9



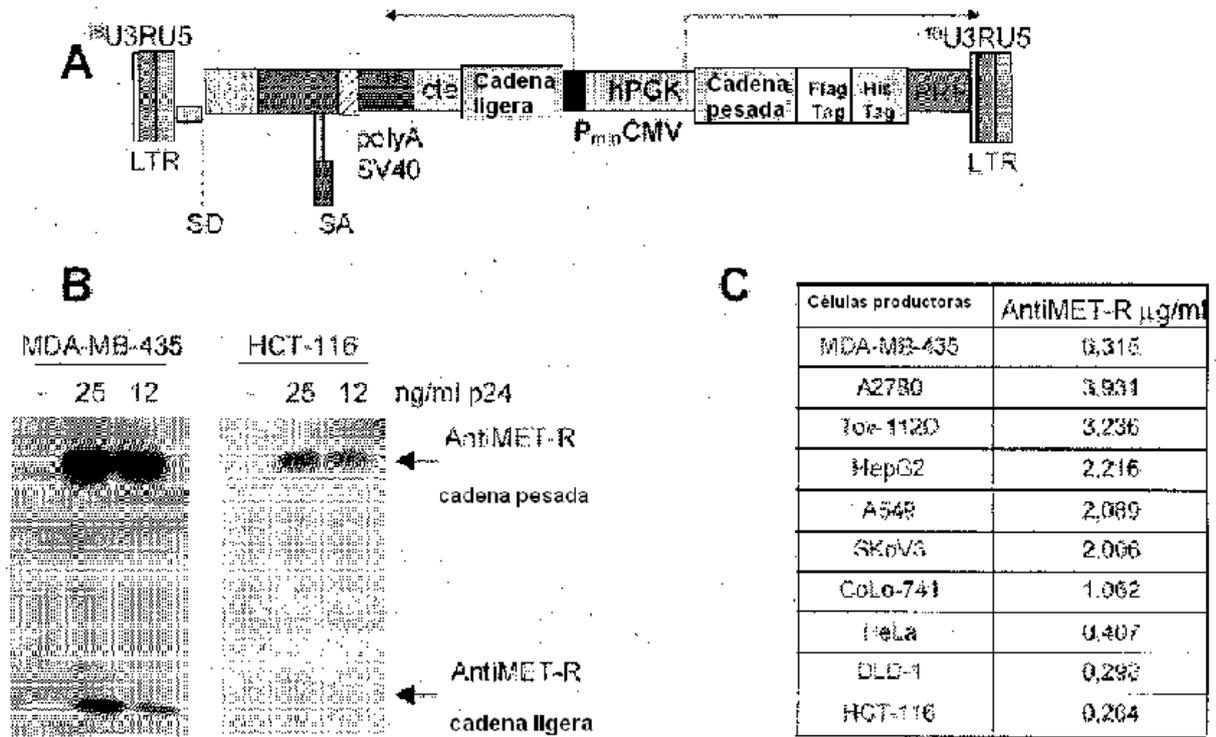


Fig. 10

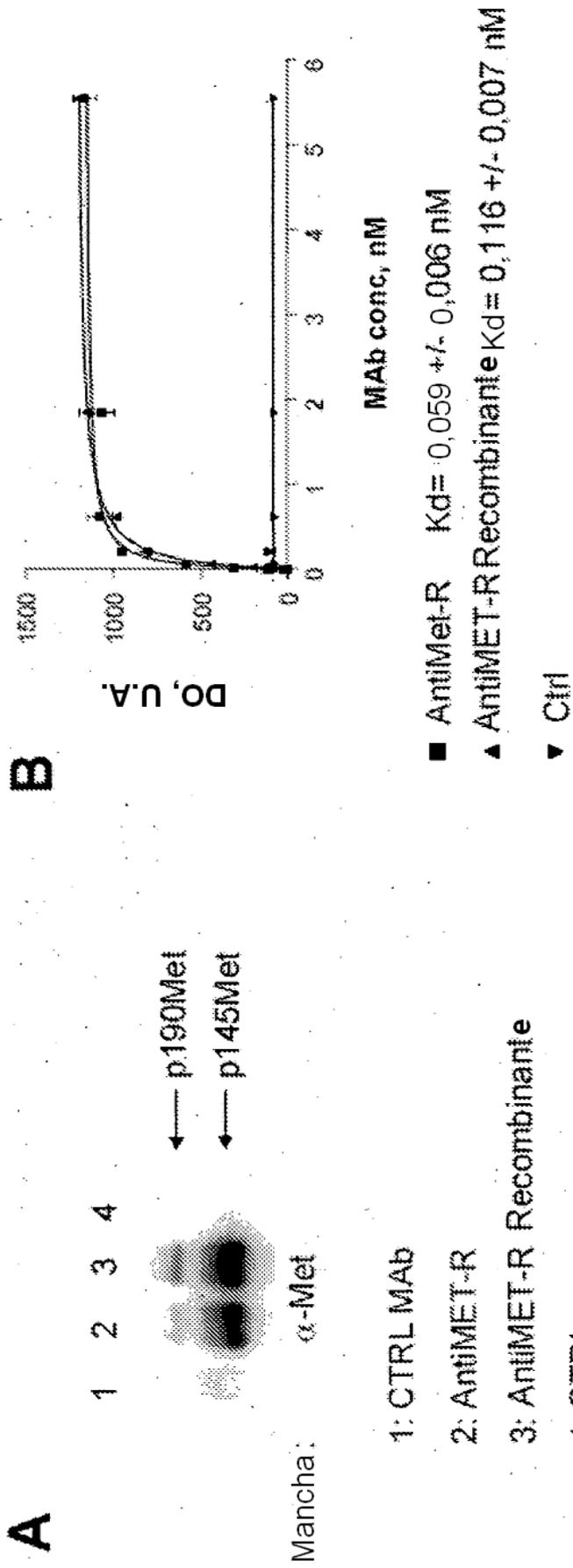


Fig. 11

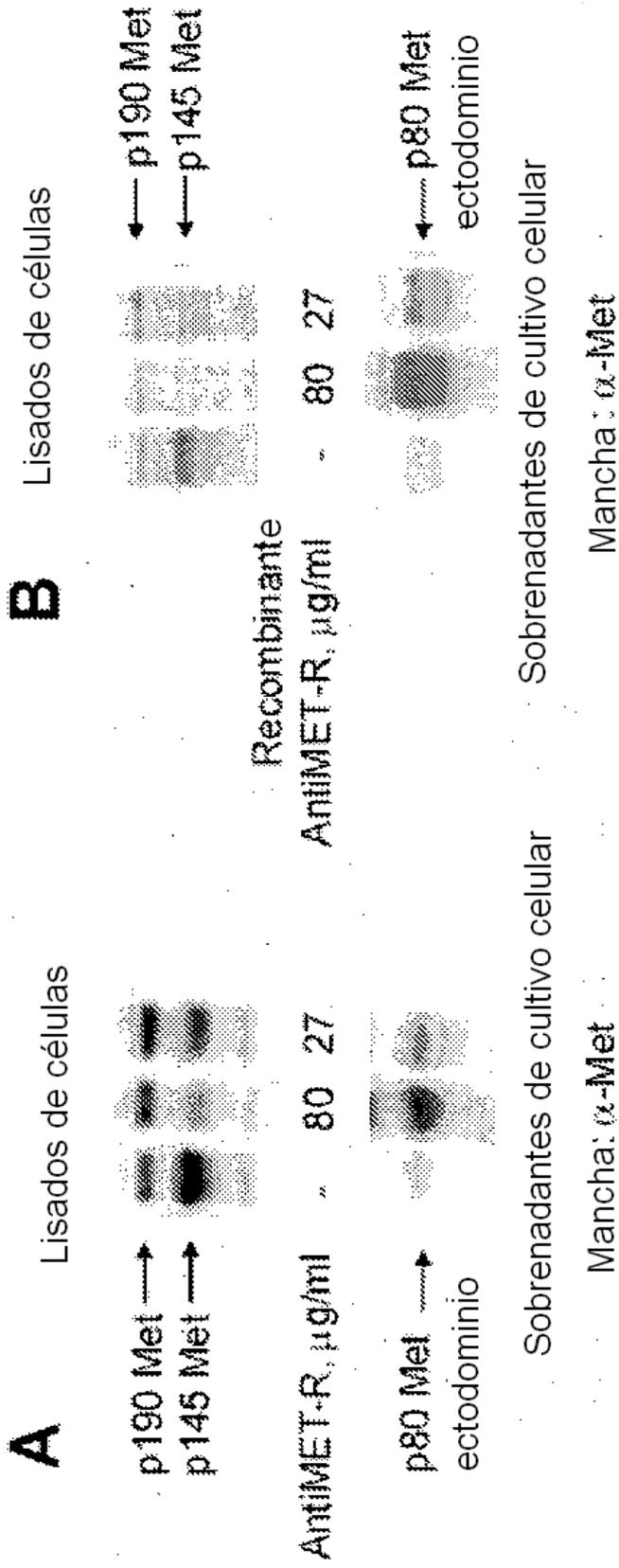
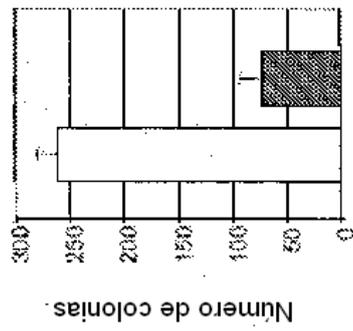
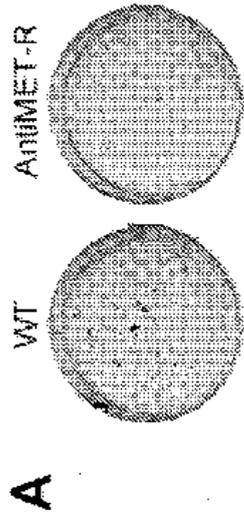
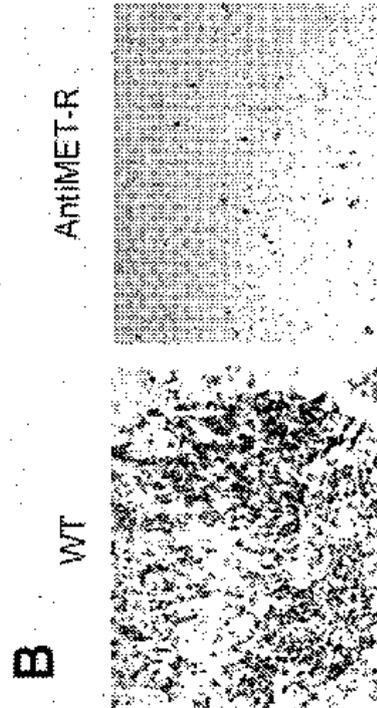


Fig. 12

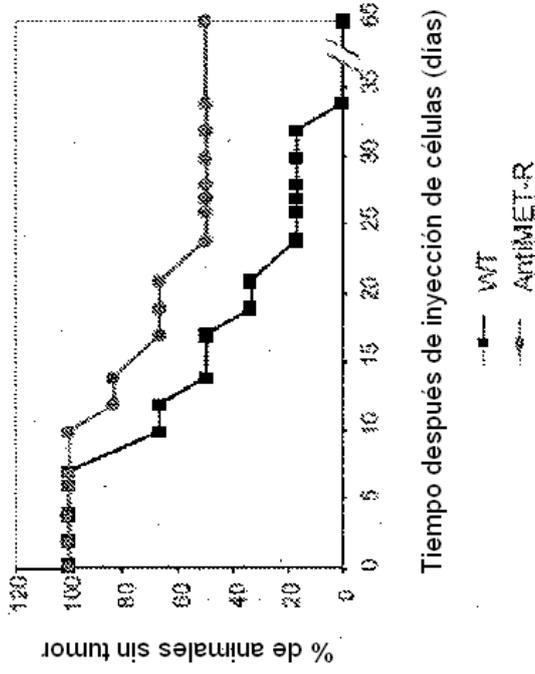
Fig 13



Tipo de célula: WT AntiMET-R



C



D

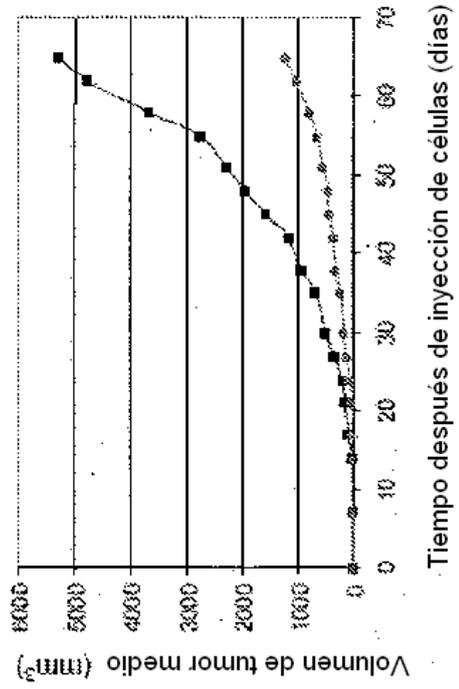


Fig. 14

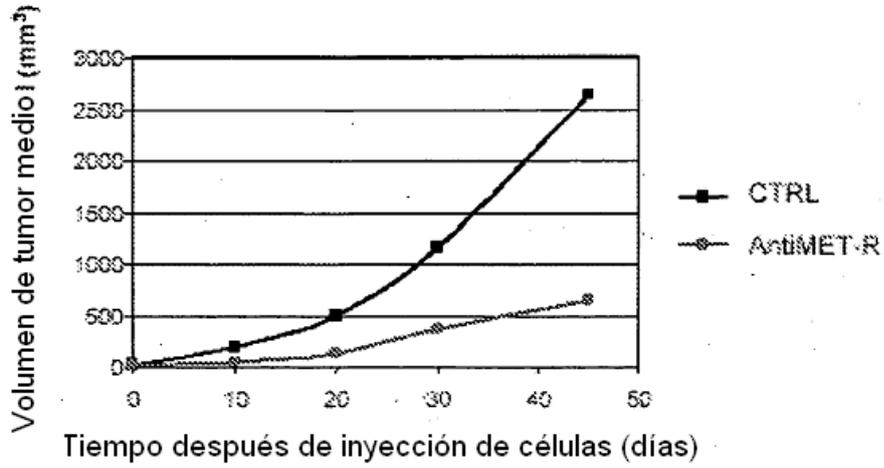


Fig. 15

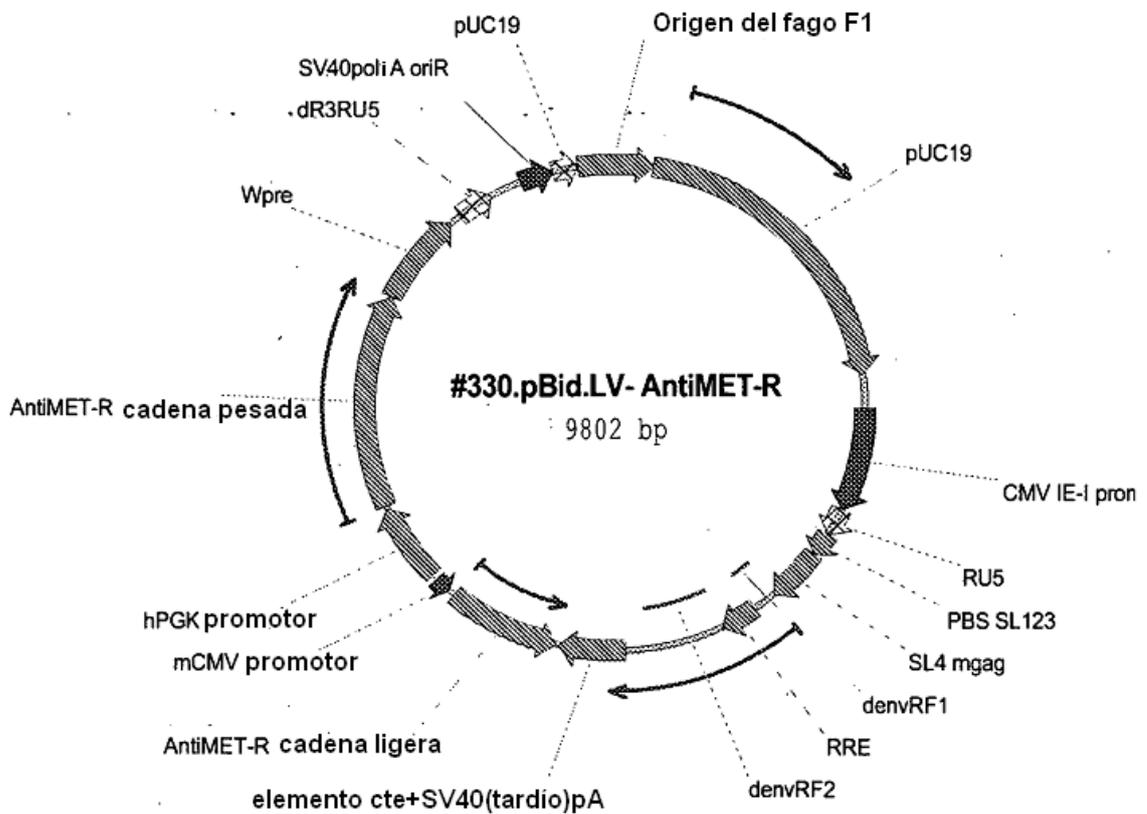


Fig. 16

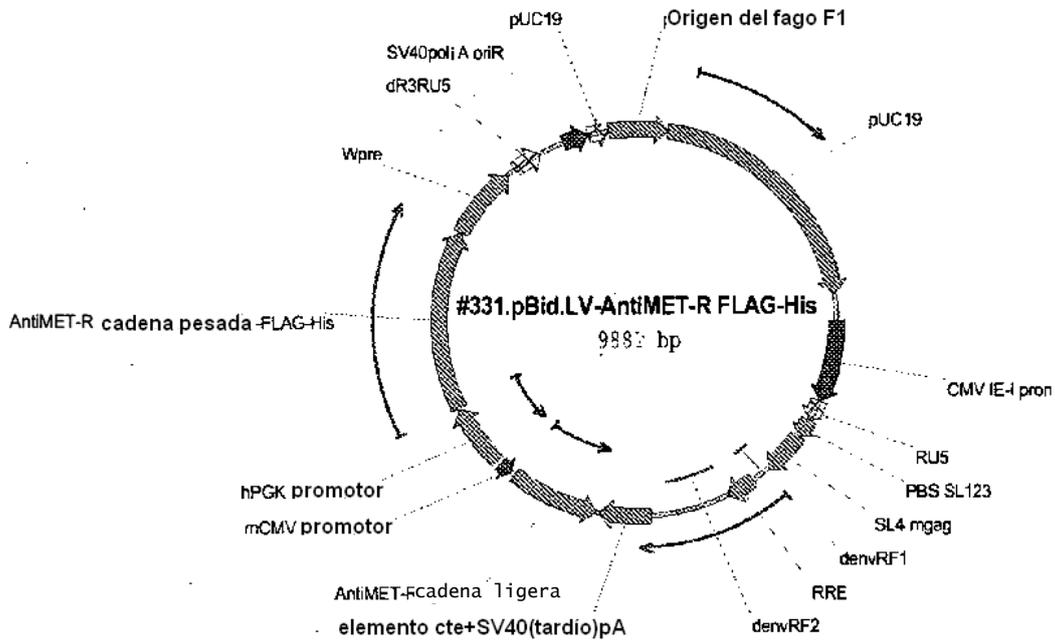


Fig. 17

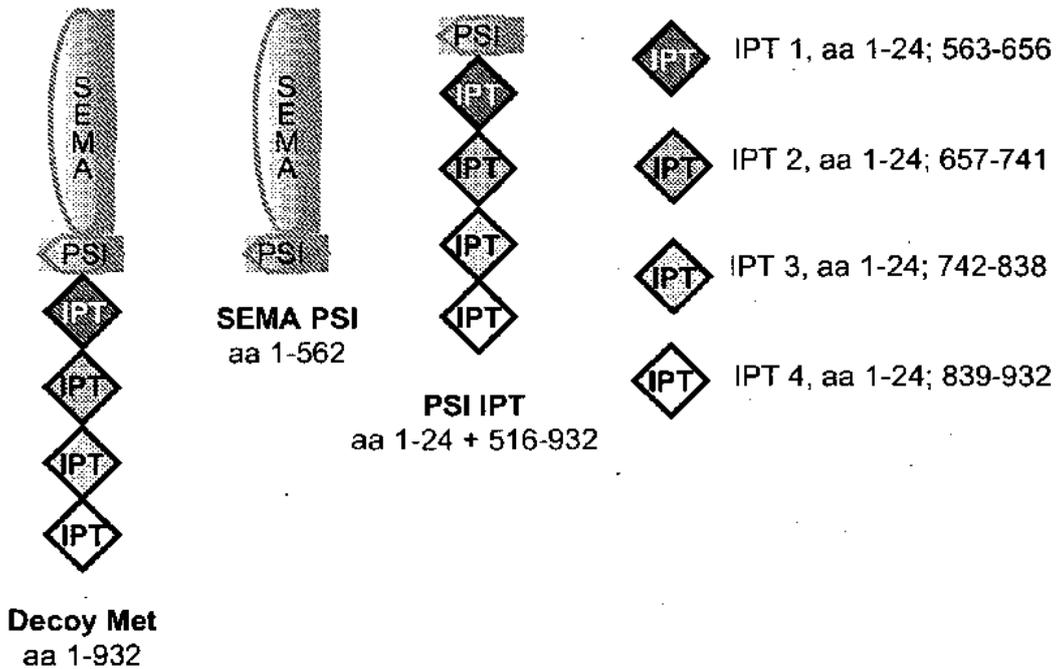


Fig. 18

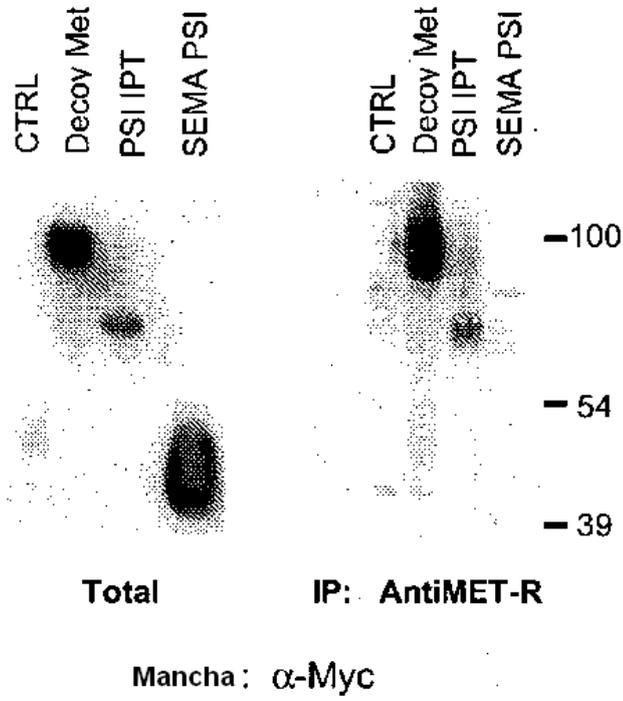


Fig. 19

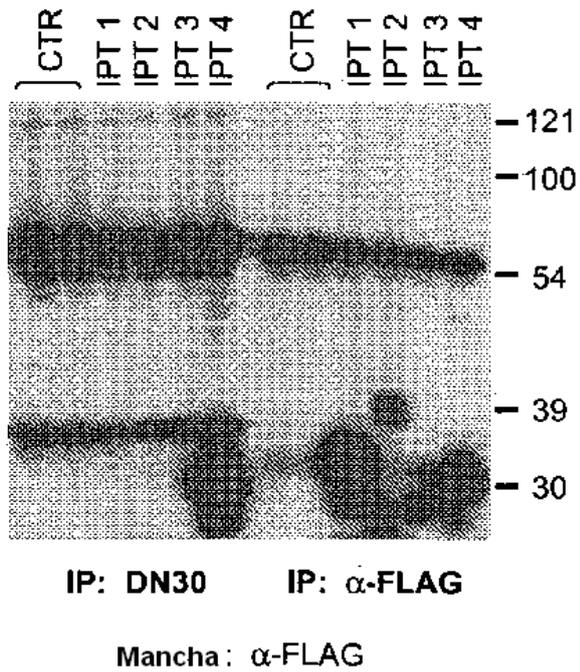
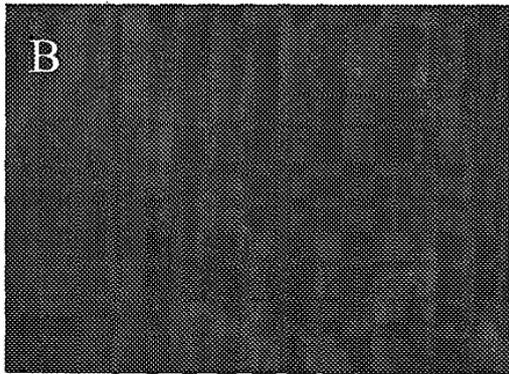
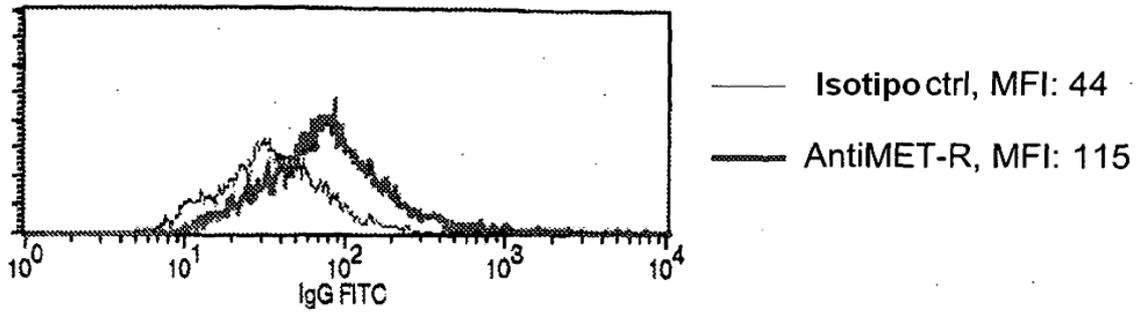
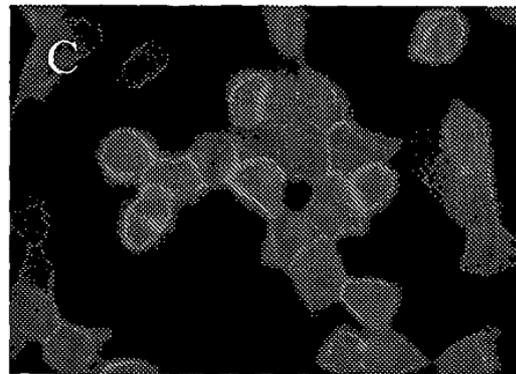


Fig. 20



Ctrl



AntiMET-R

Figura 21a

atgggatgga gctatatcat cctctttttg gtagcaacag ctacagatgg ccaactcccag 60
 gtccaactgc agcagcctgg gactgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
 tgcaaggcctt ctggctacac cttcaccagt tactggatac actgggtgaa gcagaggcct 180
 ggacaaggcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca gcggtcgtac taactacaac 240
 gagaaattca agaacaaggt cacagtgact gtagacaaat cttccaccac agcctacatg 300
 caactcagca acctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag taggggctac 360
 tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacagcccc atcgggtctat 420
 ccaactggccc ctgtgtgtgg aaatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc 480
 aagggttatt tccctgagcc agtgacctg acctggaact ctggatccct gtccagtggc 540
 gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca cctcagcag ctcagtgact 600
 gtaacctcga gcacctggcc cagccagtc atcacctgca atgtggcca cccggcaagc 660
 agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca 720
 tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttgggt ggaccatccg tcttcatctt cctccaaaag 780
 atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg 840
 agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900
 gctcagacac aaacctatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgcctc 960
 cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagtcca aatgcaaggt caacaacaaa 1020
 gacctccagc cgcctatcga gagaaccatc tcaaaacca aagggtcagt aagagctoca 1080
 caggtatatg tcttgctcc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140
 tgcattggtca cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa 1200
 acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtcttgact ctgatggttc ttacttcatg 1260
 tacagcaagc tgagagtga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca 1320
 gtggtccacg aggtctgca caatcaccac acgactaaga gcttctccc gactccgggt 1380
 aatga 1386

Figura 21b

MGWSYIILFLVATATDGHSQVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKQRPGQGLEW
 IGEINPSSGRTNYNEKFKNKVTVTVDKSSTTAYMQLSNLTSEDSAVYYCCASRGYWGQGTTLTVSSA
 KTTAPSVYPLAPVCGNTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS
 VTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDV
 LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFEVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRRVVSALPIQHQDWMSG
 KEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWT
 NNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Figura 22a

atggagacag acacaatcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ctccactggt 60
 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 120
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatgggtg gtagttatat gaggttggtc 180
 caacagagac caggacagcc acccaaactc ctcatctctg ctgcatccaa tctagaatct 240
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggc tctgggacag acttcaccct caatatccat 300
 cctgtggagg aggaggatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttatga ggatccgctc
acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 420
 atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggagggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
 actcacaaga catctacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgtag 717

Figura 22b

METDTILLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGGSYMSWFQQRPGQ
 PPKLLISAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDVATYYCQQSYEDPLTFGAGTKLELKR
 ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNIFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS
 MSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC