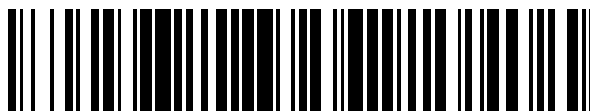


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 528**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2005 E 05810858 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1809673**

54 Título: **Moduladores del activador del factor de crecimiento de hepatocitos**

30 Prioridad:

04.10.2004 US 615657 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.03.2013

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**KIRCHHOFER, DANIEL, K. y
WU, YAN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 528 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

Moduladores del activador del factor de crecimiento de hepatocitos

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere generalmente a los campos de la molecular biología y la regulación de factores de crecimiento. Más específicamente, la invención se refiere a moduladores de la función del activador del factor de crecimiento de hepatocitos, y usos de dichos moduladores.

10

ANTECEDENTES

[0002] El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) promueve la proliferación, migración, angiogénesis, supervivencia y morfogénesis celular activando el receptor tirosina cinasa Met (revisado en 8, 9). Además de su importancia en la fisiología normal, la ruta HGF/Met participa en el crecimiento tumoral invasivo y metástasis tumorales (8). El HGF tiene alta similitud con el plasminógeno de serina proteasas y está compuesto por una cadena α que contiene un dominio N y cuatro dominios Kringle y una cadena β con homología a proteasas similares a quimi tripsina. Se secreta en la matriz extracelular como un precursor monocatenario inactivo (pro-HGF) y requiere la escisión por activación en Arg494 - Val495 para formar el heterodímero α/β ligado por disulfuro biológicamente competente (10 - 13). Esta etapa está mediada por pro-HGF que convierte serina proteasas tales como activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA) (14). El HGFA se inhibe por inhibidores de tipo Kunitz expresados sobre la superficie celular tales como las dos variantes de corte y empalme del inhibidor del activador del factor de crecimiento de hepatocitos HAI-1 (16 - 17) y HAI-1B (15) y por HAI-2 (18). HAI-2 (también conocida como bikunina placentaria) (19) también inhibe potentemente el factor XIa y la caliceína del plasma (20), mientras que HAI-1B tiene poca o ninguna actividad inhibidora (15). Por tanto, la disponibilidad biológica del conjunto de pro-HGF en la matriz extracelular está regulada por las actividades de pro-HGF convertasas tales como HGFA y sus inhibidores.

[0003] Como la activación de pro-HGF requiere la escisión por una convertasa tal como HGFA, la modulación de la función de HGFA y/o su interacción con su sustrato podría demostrar ser una solución terapéutica eficaz. A este respecto, hay una clara necesidad de identificar agentes clínicamente relevantes que puedan modular la actividad de y/o interactuar específicamente con HGFA. La invención satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios.

[0004] El anticuerpo monoclonal P1-4 es conocido en la técnica por inhibir el procesamiento de HGF por HGFA (Kataoka y col.; CANCER RESEARCH, vol. 60, páginas 6148 - 6159, 2000; Miyazawa y col.; JBC, vol. 271, nº 7, páginas 3615 - 3618, 1996).

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

[0005] La invención se refiere a procedimientos, composiciones, kits y artículos de fabricación para modular la función del activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA), modulando así efectos fisiológicos de la actividad de HGFA. La modulación de la función de HGFA puede efectuarse usando anticuerpos como se describen en el presente documento.

[0006] La invención se refiere a moléculas de modulador que pueden usarse para modular la función de HGFA. La función de HGFA se modula mediante la inhibición de la actividad de HGFA (por ejemplo, actividad proteolítica). Generalmente, las moléculas de modulador comprenden un anticuerpo como se describe en el presente documento. Las moléculas de modulador pueden efectuar la modulación tanto directamente (por ejemplo, por unión a HGFA e interfiriendo con la actividad proteolítica de HGFA) como indirectamente (por ejemplo, eligiendo como diana / dirigiendo un agente activo para HGFA en un tejido o célula, en el que el agente activo puede interferir con la actividad proteolítica de HGFA). En un aspecto, la invención proporciona una molécula antagonista que comprende un anticuerpo que se une a HGFA, en la que la unión del antagonista a HGFA interfiere con la actividad proteolítica de HGFA como se define en las reivindicaciones. La unión del antagonista a HGFA interfiere con la activación de HGF por HGFA. En una realización, el anticuerpo se une al sitio activo de HGFA. En una realización, el anticuerpo se une a HGFA en una posición distinta del sitio activo de HGFA (por ejemplo, un exosito). En una realización, la unión del anticuerpo a HGFA en una posición distinta del sitio activo de HGFA inhibe la interacción de HGFA con su molécula de sustrato. En una realización, la unión del anticuerpo a HGFA en una posición distinta del sitio activo de HGFA inhibe la actividad proteolítica de HGFA.

[0007] En un aspecto, la invención proporciona antagonistas que alteran la ruta de señalización HGF/c-met. Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo que inhibe la escisión por HGFA de proHGF (por ejemplo, escisión en la posición R494-V495). El anticuerpo puede ejercer su función inhibidora en cualquier número de

formas que incluyen, pero no se limitan a, unión a HGFA en su sitio activo y/o en un sitio distinto del sitio activo (por ejemplo, un exosito) de forma que se inhiba la escisión por HGFA de proHGF. La molécula puede unirse a HGFA en forma complejada o sin complejar. La molécula también puede ejercer su función inhibidora interfiriendo con uno o más aspectos del proceso de activación de HGF. Por ejemplo, una molécula antagonista puede unirse al complejo 5 HGFA-proHGF de forma que se inhiba la escisión de proHGF. La unión de la molécula a proHGF o HGFA (individualmente o en complejo) puede inhibir la liberación de HGF posterior a la escisión por HGFA. Una molécula antagonista puede no inhibir la unión de HGF a c-met. Por ejemplo, una molécula antagonista de la invención no es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene capacidad inhibidora y/o de unión similar como el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el número de acceso de la Colección americana de 10 cultivos tipo ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). Una molécula antagonista de la invención inhibe actividades biológicas asociadas a la activación de HGF/c-met.

[0008] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende una región CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 21, 30, 36 ó 39. En un aspecto, la invención 15 proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende una región CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4, 7, 10, 22, 31, 37 ó 40. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende una región CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, 8, 11, 23, 32, 38 ó 41. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende una región CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 21, 30, 36 ó 39, y una región CDR-H2 que 20 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4, 7, 10, 22, 31, 37 ó 40. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende una región CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 21, 30, 36 ó 39, y una región CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, 8, 11, 23, 32, 38 ó 41. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende una región CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4, 7, 10, 22, 31, 37 ó 40, y una región CDR-H3 que 25 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, 8, 11, 23, 32, 38 ó 41. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende una región CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, 6, 9, 21, 30, 36 ó 39, una región CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4, 7, 10, 22, 31, 37 ó 40, y una región CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, 8, 11, 23, 32, 38 ó 41.

30 **[0009]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende las tres siguientes:

- (i) una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3;
- (ii) una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4;
- 35 (iii) una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5.

[0010] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende las tres siguientes:

- 40 (i) una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6;
- (ii) una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7;
- (iii) una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.

[0011] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende las 45 tres siguientes:

- (i) una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9;
- (ii) una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10;
- 50 (iii) una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11.

[0012] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende las tres siguientes:

- 55 (i) una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21;
- (ii) una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 22;
- (iii) una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23.

[0013] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende las tres siguientes:

- 60 (i) una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30;
- (ii) una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 31;
- (iii) una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 32.

[0014] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende las tres siguientes:

- 5 (i) una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36;
 (ii) una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37;
 (iii) una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 38.

[0015] En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según las reivindicaciones que comprende las tres siguientes:

- (i) una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 39;
 (ii) una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 40;
 (iii) una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 41.

15

[0016] Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-44 se numeran con respecto a CDR individual (es decir, H1, H2 o H3) como se indica en la Figura 1, estando la numeración de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat que se describe más adelante.

20 **[0017]** En una realización, un anticuerpo de la invención según las reivindicaciones comprende una secuencia (s) de CDR del dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de al menos una, al menos dos o las tres secuencias de H1 (SEQ ID NO: 71 - 73, 77, 80, 82, 83), H2 (SEQ ID NO: 85 - 87, 91, 94, 96, 97) y/o H3 (SEQ ID NO: 99 - 101, 105, 108, 110, 111) para cada clon representado en las Figuras 1B, 1C y 1D.

25 **[0018]** En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos según las reivindicaciones que comprenden secuencias de CDR de la cadena pesada como se representan en la Figura 1A, B, C y D. En alguna realización, estos anticuerpos comprenden además un dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo para 4D5 humanizado (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE.UU.) (también citado en la patente de EE.UU. n° 6.407.213 y Lee y col., J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073 - 93) como se representa en SEQ ID NO: 45 a
 30 continuación.

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Glu Ser Gly
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr (SEQ ID NO:45)

[0019] En una realización, la secuencia del dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8 está
 35 modificada en una o más de las posiciones 30, 66 y 91 (Asn, Arg y His como se indica en **negrita** / *cursiva* anteriormente, respectivamente). En una realización, la secuencia de huMAb4D5-8 modificada comprende Ser en la posición 30, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. Por consiguiente, en una realización, un anticuerpo de la invención según las reivindicaciones comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 54 a continuación:

40

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser *Gly* Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEQ ID NO: 54) (los residuos de CDR
 están subrayados)

[0020] Los residuos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 se indican en negrita / cursiva anteriormente.

5 **[0021]** Los anticuerpos de la invención pueden comprender además cualquier secuencia de la región estructural y/o del dominio variable de la cadena ligera adecuada, siempre que la actividad de HGFA de unión sea sustancialmente retenida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de la región estructural de la cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de la región estructural comprende sustitución en la posición 71, 73 y/o
 10 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de la región estructural del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo para 4D5 humanizado (huMAb 4D5-8) (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE.UU.) (también citado en la patente de EE.UU. n.º 6.407.213 y Lee y col., J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073 - 93). En una realización, el anticuerpo para 4D5-8 humanizado es como se describe en la patente de EE.UU. n.º
 15 6.407.213. En una realización, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de la región estructural de la cadena ligera kl humana. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo para 4D5 humanizado (huMAb 4D5-8) (SEQ ID NO: 45) (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE.UU.) (también citado en la patente de EE.UU. n.º 6.407.213 y Lee y col., J. Mol. Biol. (2004), 340 (5): 1073 - 93), o la variante modificada del mismo como se
 20 representa en SEQ ID NO: 54.

[0022] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de la región estructural comprende las secuencias de SEQ ID NO: 46, 47, 48 y 49 (FR1, 2, 3, y 4, respectivamente), y las secuencias de CDR H1, H2 y H3 como se representa en la Figura 1A, B, C y/o D. En
 25 una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO: 50, 51, 52 y 53 (FR1, 2, 3 y 4, respectivamente), y secuencias de CDR L1, L2 y L3 como se representa en SEQ ID NO: 54.

[0023] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO: 59, 60, 61 y 62 (FR1, 2, 3 y
 30 4, respectivamente) (FIG. 1E), y secuencias de CDR H1, H2 y H3 como se representa en la Figura 1. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55, 56, 57 y 58 (FR1, 2, 3 y 4, respectivamente) (FIG. 1E), y secuencias de CDR L1, L2 y L3 como se representa en SEQ ID NO: 54.

[0024] En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO: 67, 68, 69 y 70 (FR1, 2, 3 y
 4, respectivamente) (FIG. 1F), y secuencias de CDR H1, H2 y H3 como se representa en FIG. 1A, B, C y/o D. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la
 40 secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO: 63, 64, 65 y 66 (FR1, 2, 3 y 4, respectivamente) (FIG. 1F), y secuencias de CDR L1, L2 y L3 como se representa en SEQ ID NO: 54.

[0025] En el presente documento se describe un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados por unirse a HGFA, que es un anticuerpo que se une al mismo epítoto sobre HGFA que
 45 cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados. En una realización, un anticuerpo de la invención es madurado por afinidad, humanizado, quimérico o humano. En una realización, un anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo (como se describe en el presente documento), o un anticuerpo de longitud sustancialmente completa. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende una región Fc natural, o una variante de la misma. En una realización, un anticuerpo de la invención es una IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgE
 50 o IgD.

- [0026]** Una molécula antagonista puede ligarse a una toxina tal como un agente citotóxico. Estas moléculas / sustancias pueden formularse o administrarse en combinación con un aditivo / agente potenciador tal como un agente de radiación y/o quimioterapéutico.
- 5 **[0027]** La invención también proporciona usos y composiciones médicas para modular estados de enfermedad asociados a desregulación del eje de señalización HGF/c-met. Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento de modular la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto dicho anticuerpo que inhibe la escisión por HGFA de proHGF, por lo que la activación de c-met se modula como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la
- 10 invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento para tratar una afección patológica asociada a activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto dicho anticuerpo que inhibe la escisión por HGFA de proHGF, por lo que la activación de c-met se inhibe como se define en las reivindicaciones.
- 15 **[0028]** La ruta de señalización HGF/c-met participa en múltiples funciones biológicas y fisiológicas que incluyen, por ejemplo, estimulación del crecimiento celular (por ejemplo, proliferación celular, supervivencia de células, migración de células, morfogénesis de células) y angiogénesis. Por tanto, un procedimiento puede ser un procedimiento para inhibir el crecimiento celular activado por c-met (por ejemplo, proliferación y/o supervivencia), comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una célula o tejido con un antagonista, por lo que se inhibe la
- 20 proliferación celular asociada a activación de c-met. En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento para inhibir angiogénesis, comprendiendo dicho procedimiento administrar a una célula, tejido y/o sujeto con una afección asociada a angiogénesis anormal dicho anticuerpo, por lo que se inhibe la angiogénesis.
- 25 **[0029]** En un aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad que es un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.
- 30 **[0030]** En un aspecto, la invención se refiere al uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.
- 35 **[0031]** En un aspecto, la invención se refiere al uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.
- 40 **[0032]** En un aspecto, la invención se refiere al uso de una célula huésped de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.
- 45 **[0033]** En un aspecto, la invención se refiere al uso de un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.
- 50 **[0034]** En un aspecto, la invención se refiere al uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.
- 55 **[0035]** En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para inhibir la proliferación celular activada por c-met, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una célula o tejido con una cantidad eficaz de una molécula moduladora de la invención, por lo que se inhibe la proliferación celular asociada a activación de c-met.
- [0036]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento
- 60 para tratar una afección patológica asociada a desregulación de la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de dicho anticuerpo de la invención, por lo que dicha afección se trata como se define en las reivindicaciones.

- [0037]** En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una molécula moduladora de la invención provocándose así una inhibición del crecimiento de dicha célula. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, por un efecto paracrino).
- [0038]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento de tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de dicho anticuerpo de la invención, tratando así eficazmente dicho mamífero. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, por un efecto paracrino).
- [0039]** En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno de células proliferativas asociado al aumento de la expresión o actividad de HGFA, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de una molécula moduladora de la invención, tratando así eficazmente o previniendo dicho trastorno proliferativo de células. En una realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer.
- [0040]** En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno de células proliferativas asociado al aumento de la expresión o actividad de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de una molécula moduladora de la invención, tratando así eficazmente o previniendo dicho trastorno proliferativo de células. En una realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer.
- [0041]** En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de HGFA, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de una molécula moduladora de la invención, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, por un efecto paracrino).
- [0042]** En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de una molécula moduladora de la invención, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, por un efecto paracrino).
- [0043]** En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un procedimiento de tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de HGFA, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de dicho anticuerpo de la invención, tratando así eficazmente dicho tumor. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, por un efecto paracrino); o
- [0044]** para su uso en un procedimiento de tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de dicho anticuerpo de la invención, tratando así eficazmente dicho tumor. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, por un efecto paracrino).
- [0045]** Pueden usarse usos médicos de la invención para afectar cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados a desregulación de la ruta de señalización HGF/c-met, por ejemplo, mediante un aumento de la actividad de HGF asociada a activación por HGFA de HGF. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de carcinoma papilar (por ejemplo, de la glándula tiroides), una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cuello de útero, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer de próstata, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma y una célula de leucemia. En una realización, una célula que es elegida como diana en un

procedimiento de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula displásica. En otra realización más, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula metastásica.

5 **[0046]** Usos médicos de la invención pueden comprender además etapas de tratamiento adicionales en los procedimientos. Por ejemplo, en una realización, un procedimiento comprende además una etapa en la que una célula y/o tejido elegido como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a tratamiento con radiación o un agente quimioterapéutico.

10 **[0047]** Como se describe en el presente documento, la activación de HGF/c-met es un proceso biológico importante de la desregulación que conduce a numerosas afecciones patológicas. Por consiguiente, en algunos procedimientos, una célula que es elegida como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) es una en la que la activación de HGF/c-met es potenciada con respecto a una célula normal del mismo origen de tejido. En una realización, un procedimiento produce la muerte de una célula elegida como diana. Por ejemplo, el contacto con una
15 molécula moduladora puede producir la incapacidad de una célula para señalar mediante la ruta de c-met, que produce muerte celular.

[0048] La desregulación de la activación de c-met (y, por tanto, la señalización) puede producir varios cambios celulares que incluyen, por ejemplo, expresión en exceso de HGF (ligando semejante a c-met) y/o HGFA, y/o
20 aumento de la activación de HGF por HGFA. Por consiguiente, en algunos casos, un procedimiento comprende elegir como diana un tejido en el que uno o más de HGFA, c-met y factor de crecimiento de hepatocitos se expresa más abundantemente y/o está presente (por ejemplo, un cáncer) con respecto a un tejido normal del mismo origen. Una célula que expresa HGF o c-met puede regularse por HGFA a partir de una variedad de fuentes, es decir, en un modo autocrino o paracrino. Por ejemplo, en un procedimiento, una célula elegida como diana se pone en contacto /
25 se une por factor de crecimiento de hepatocitos activado por HGFA expresado en una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino). Dicha célula diferente puede ser del mismo origen de tejido o de un origen de tejido diferente. En otro procedimiento, una célula elegida como diana se pone en contacto / se une por HGF activado por HGFA expresado por la propia célula elegida como diana (por ejemplo, mediante un efecto / bucle autocrino).

30 **[0049]** En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

[0050] En un aspecto, la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican una molécula moduladora de la invención. Un ácido nucleico de la invención codifica una molécula moduladora que es o comprende un anticuerpo o
35 fragmento del mismo.

[0051] En un aspecto, la invención se refiere a vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

[0052] En un aspecto, la invención se refiere a células huésped que comprenden un ácido nucleico o un
40 vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante tal como un vector de expresión. Puede usarse cualquiera de una variedad de células huésped. En un ejemplo, una célula huésped es una célula procarionota, por ejemplo, *E. coli*. En un ejemplo, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

45 **[0053]** Los procedimientos para preparar una molécula moduladora de la invención se describen en el presente documento. Por ejemplo, se describe un procedimiento de preparación de una molécula moduladora que es o comprende un anticuerpo (o fragmento del mismo), comprendiendo dicho procedimiento expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), y recuperar dicho anticuerpo.

50

[0054] En un aspecto, la invención se refiere a un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en el que la composición comprende una o más moléculas moduladoras de la invención. La composición puede comprender un ácido nucleico de la invención. Una composición que comprende una molécula moduladora puede comprender además un vehículo, que en algunos
55 casos es farmacéuticamente aceptable. Un artículo de fabricación puede comprender además instrucciones para administrar la composición (para, por ejemplo, la molécula moduladora) a un sujeto.

[0055] En un aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende una o más moléculas moduladoras de la invención; y un segundo recipiente que
60 comprende un tampón. El tampón puede ser farmacéuticamente aceptable. Una composición que comprende una molécula moduladora puede comprender además un vehículo, que en algunos casos es farmacéuticamente aceptable. Un kit puede comprender además instrucciones para administrar la composición (para, por ejemplo, la molécula moduladora) a un sujeto.

[0056] En el presente documento también se describe un procedimiento de diagnosticar una enfermedad que comprende determinar el nivel de HGFA en una muestra de prueba de células de tejido poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención, por lo que el HGFA unido por el anticuerpo indica la presencia y/o cantidad de HGFA en la muestra. En el presente documento también se describe un procedimiento de determinar si un individuo está en riesgo de una enfermedad que comprende determinar el nivel de HGFA en una muestra de prueba de célula de tejido poniendo en contacto la muestra de prueba con un anticuerpo de la invención y determinando así la cantidad de HGFA presente en la muestra, en el que un nivel superior de HGFA en la muestra de prueba, con respecto a una muestra de control que comprende tejido normal del mismo origen de célula que la muestra de prueba, es una indicación de que el individuo está en riesgo de la enfermedad. El nivel de HGFA puede determinarse basándose en la cantidad de polipéptido de HGFA indicada por la cantidad de HGFA unido por el anticuerpo en la muestra de prueba. Un anticuerpo empleado en el procedimiento puede estar opcionalmente detectablemente marcado, unido a un soporte sólido, o similares.

[0057] En el presente documento también se describe un procedimiento de unión de un anticuerpo de la invención a HGFA presente en un fluido corporal, por ejemplo, sangre, y

[0058] un procedimiento de unión de un anticuerpo de la invención a una célula que expresa y/o es sensible a HGFA, en el que el procedimiento comprende poner en contacto dicha célula con dicho anticuerpo en condiciones que son adecuadas para la unión del anticuerpo a HGFA y permitir la unión entre ellos. La unión de dicho anticuerpo a HGFA sobre la célula pueden inhibir una función biológica de HGFA. Dicho anticuerpo puede no inhibir la interacción de HGFA con su molécula de sustrato. Dicho anticuerpo pueden unirse a una molécula de HGFA sobre la célula e inhibir la unión de otra molécula (tal como pro-HGF) a la molécula de HGFA.

[0059] En el presente documento también se describe un procedimiento de elegir como diana un agente terapéutico para un tejido asociado a HGFA en un huésped, comprendiendo el procedimiento administrar al huésped dicho agente terapéutico en una forma que está ligada a un anticuerpo de la invención, por lo que el agente es elegido como diana para tejido asociado a HGFA en el huésped. El anticuerpo que se une a HGFA puede ser capaz de unirse específicamente a HGFA localizado sobre una célula (tanto *in vitro* como *in vivo*), por ejemplo, en el que HGFA está presente sobre la superficie de una célula.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0060]

Fig. 1 (A) Secuencias del bucle de CDR de la cadena pesada de anticuerpos anti-HGFA. La figura muestra las secuencias de CDR de la cadena pesada, H1, H2 y H3. La secuencia de la cadena ligera es la secuencia de 4D5 humanizada (véase Lee y col., arriba). La numeración de secuencias es del siguiente modo: clon 33 (CDRH1 es SEQ ID NO: 3; CDRH2 es SEQ ID NO: 4; CDRH3 es SEQ ID NO: 5); clon 35 (CDRH1 es SEQ ID NO: 6; CDRH2 es SEQ ID NO: 7; CDRH3 es SEQ ID NO: 8); clon 37 (CDRH1 es SEQ ID NO: 9; CDRH2 es SEQ ID NO: 10; CDRH3 es SEQ ID NO: 11); clon 39 (CDRH1 es SEQ ID NO: 12; CDRH2 es SEQ ID NO: 13; CDRH3 es SEQ ID NO: 14); clon 42 (CDRH1 es SEQ ID NO: 15; CDRH2 es SEQ ID NO: 16; CDRH3 es SEQ ID NO: 17); clon 49 (CDRH1 es SEQ ID NO: 18; CDRH2 es SEQ ID NO: 19; CDRH3 es SEQ ID NO: 20); clon 58 (CDRH1 es SEQ ID NO: 21; CDRH2 es SEQ ID NO: 22; CDRH3 es SEQ ID NO: 23); clon 61 (CDRH1 es SEQ ID NO: 24; CDRH2 es SEQ ID NO: 25; CDRH3 es SEQ ID NO: 26); clon 74 (CDRH1 es SEQ ID NO: 27; CDRH2 es SEQ ID NO: 28; CDRH3 es SEQ ID NO: 29); clon 75 (CDRH1 es SEQ ID NO: 30; CDRH2 es SEQ ID NO: 31; CDRH3 es SEQ ID NO: 32); clon 86 (CDRH1 es SEQ ID NO: 33; CDRH2 es SEQ ID NO: 34; CDRH3 es SEQ ID NO: 35); clon 90 (CDRH1 es SEQ ID NO: 36; CDRH2 es SEQ ID NO: 37; CDRH3 es SEQ ID NO: 38); clon 91 (CDRH1 es SEQ ID NO: 39; CDRH2 es SEQ ID NO: 40; CDRH3 es SEQ ID NO: 41); clon 95 (CDRH1 es SEQ ID NO: 42; CDRH2 es SEQ ID NO: 43; CDRH3 es SEQ ID NO: 44). Las posiciones de aminoácidos se numeran según el sistema de numeración de Kabat que se describe más adelante. Los valores de CI_{50} también se indican en la última columna (a mano derecha). (B), (C) y (D) Secuencias del bucle de CDR de la cadena pesada de anticuerpos anti-HGFA. (E) y (F) Secuencias de la región estructural a modo de ejemplo. (E) Secuencias de la región estructural de HuMAb4D5-8. (F) Secuencias de la región estructural de HuMAb4D5-8 que comprenden modificaciones.

Fig. 2 Inhibición de la activación de proHGF mediada por HGFA por anticuerpos anti-HGFA. HGFA se incubó con proHGF marcado con ^{125}I y anticuerpos anti-HGFA durante 4 h a 37 °C. Las concentraciones de reactivo fueron 50 µg/ml de proHGF, HGFA 2 nM y 0,1 mg/ml (0,67 µM) de anticuerpos. Se analizaron alícuotas por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Se usó HAI-1B soluble (sHAI-1B) como inhibidor de control a concentración final 1 µM. A. Carril 1: (t = 0) es la alícuota tomada al principio de

la reacción, carril 2: sin inhibidor, carril 3: sHAI-1B (1 μ M), carril 4: n° 33, carril 5: n° 35, carril 6: n° 39, carril 7: n° 49, carril 8: n° 74, carril 9: n° 61. B. Carril 1: n° 42, carril 2: n° 91, carril 3: 58, carril 4: n° 37, carril 5: n° 75, carril 6: n° 90, carril 7: n° 86, carril 8: n° 95.

5 Fig. 3 Potente inhibición de la conversión de proHGF mediada por HGFA por el anticuerpo n° 58. Se usaron tres concentraciones diferentes del anticuerpo n° 58 y el anticuerpo no bloqueante n° 49 en experimentos de conversión de proHGF marcado con 125 I llevados a cabo como se describe en la Figura 1. Carril 1: (t = 0) es la alícuota tomada al principio de la reacción, carril 2: sin inhibidor, carril 3: sHAI-1B (1 μ M), carril 4: 0, Ab n° 49 67 μ M, carril 5: Ab n° 49 0,13 μ M, carril 6: Ab n° 49 0,03 μ M, carril 7: Ab n° 58 0,67 μ M, carril 8: Ab n° 58 0,13 μ M, carril 9: Ab n° 58 0,03 μ M.

10 Fig. 4 Inhibición dependiente de la concentración de la actividad amidolítica de HGFA por anticuerpos anti-HGFA 58 y 75. Se incubaron diversas concentraciones de anticuerpos con HGFA (concentración final 5 nM) en tampón HBSA durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la adición de Spectrozyme® fVIIa (conc. final 200 μ M, K_M = 200 μ M), las tasas lineales de activación de sustrato se midieron en un lector de microplacas cinético. La inhibición de la actividad enzimática se expresó como actividad fraccionaria (vi/vo) de actividad sin inhibir.

15 Fig. 5 Inhibición de la actividad amidolítica de HGFA por IV-49C y un aglutinante de sitios activos de molécula pequeña / inhibidor. Se incubaron diversas concentraciones de inhibidores con HGFA (2,5 nM para IV-49C y 5 nM para la molécula pequeña, respectivamente) en tampón HBSA durante 20 min a temperatura ambiente. La inhibición enzimática de la activación de Spectrozyme® fVIIa se midió como se describe en la Figura 4. A. Inhibición por el inhibidor del dominio de Kunitz IV-49C (círculos rellenos) en comparación con el inhibidor de tripsina de trigo del inhibidor del factor XIIa específico (círculos blancos). B. Inhibición por el inhibidor de molécula pequeña (triángulos rellenos).

20 Fig. 6 Mediciones de resonancia de plasmones superficiales de la unión de HGFA a los anticuerpos anti-HGFA n° 58 y n° 75. Los anticuerpos anti-HGFA (IgG1 de longitud completa) se inmovilizaron sobre chips BIAcore y los datos de la unión se recogieron a partir de diversas concentraciones de HGFA. Para estudios de unión por competencia, HGFA (70 nM) se incubó previamente con diversas concentraciones de sHAI-1B, IV-49C o ligador de sitios activos de molécula pequeña. A - D: La unión de HGFA al anticuerpo n° 58 (A) en ausencia de inhibidor, o en presencia de (B) sHAI-1B, (C) IV-49C y (D) ligador de sitios activos de molécula pequeña. E - H: La unión de HGFA al anticuerpo n° 75 (E) en ausencia de inhibidor, o en presencia de (F) sHAI-1B, (G) IV-49C y (H) ligador de sitios activos de molécula pequeña.

25 Fig. 7 Secuencias de secuencias de proteínas de HGFA humano (línea superior; SEQ ID NO: 1) y murino (línea inferior; SEQ ID NO: 2).

30 Fig. 8 Tabla que muestra datos relacionados con la inhibición de la actividad enzimática de HGFA por diversos anticuerpos anti-HGFA.

35 Fig. 9 Tabla que muestran datos relacionados con la unión de HGFA a anticuerpos anti-HGFA.

45 MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

[0061] La invención se refiere a procedimientos, composiciones, kits y artículos de fabricación que comprenden moduladores de la función del activador del factor de crecimiento de hepatocitos que incluyen procedimientos de uso de tales moduladores.

50 [0062] Detalles de estos procedimientos, composiciones, kits y artículos de fabricación se proporcionan en el presente documento.

Técnicas generales

55 [0063] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de molecular biología (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la habilidad de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis y col., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas y col., 2001).

Definiciones

[0064] El término “activador del factor de crecimiento de hepatocitos” o “HGFA” como se usa en el presente documento engloba polipéptidos de secuencia nativa, variantes de polipéptido y fragmentos de un polipéptido de secuencia nativa y variantes de polipéptido (que se definen adicionalmente en el presente documento) que pueden escindir proHGF de un modo similar a HGFA natural. El polipéptido de HGFA descrito en el presente documento puede ser aquel que se aísla de una variedad de fuentes, tal como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por procedimientos recombinantes o sintéticos. Los términos “HGFA”, “polipéptido de HGFA”, “enzima de HGFA” y “proteína de HGFA” también incluyen variantes de un polipéptido de HGFA como se desvela en el presente documento.

[0065] Un “polipéptido de HGFA de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de HGFA correspondiente derivado de la naturaleza (por ejemplo, las secuencias representadas en la Figura 7). En una realización, un polipéptido de HGFA de secuencia nativa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (véase la Figura 7; secuencia superior). Tal polipéptido de HGFA de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido de HGFA de secuencia nativa” engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente del polipéptido de HGFA específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variante que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que se producen naturalmente del polipéptido.

[0066] “Variante de polipéptido de HGFA”, o variaciones de la misma, significa un polipéptido de HGFA, generalmente un polipéptido de HGFA activo, como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencias de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de polipéptidos de HGFA de secuencia nativa como se desvela en el presente documento. Tales variantes de polipéptido de HGFA incluyen, por ejemplo, polipéptidos de HGFA en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o delecionan, en el extremo N o C de una secuencia de aminoácidos nativa. Generalmente, una variante de polipéptido de HGFA tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencias de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencias de aminoácidos, con una secuencia de polipéptidos de HGFA de secuencia nativa como se desvela en el presente documento. Generalmente, los polipéptidos de variante de HGFA tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, los polipéptidos de variante de HGFA no tendrán más de una sustitución de aminoácidos conservativa con respecto a una secuencia de polipéptidos de HGFA nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a la secuencia de polipéptidos de HGFA nativa.

[0067] “Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos” con respecto a una secuencia de péptidos o polipéptidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de péptidos o polipéptidos específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en el presente documento, los valores del % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que la fuente completa que codifica el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla A más adelante ha sido presentado con documentación de usuario en la Oficina de derechos de autor estadounidense, Washington, DC, 20559, en la que está registrado bajo el nº de registro de derechos de autor estadounidense TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la Figura 8 más adelante. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso con un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0068] En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencias de aminoácidos para, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula del siguiente modo:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

10 en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en ese alineamiento del programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencias de aminoácidos de B con respecto a A.

15 **[0069]** A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

Table A

```

/*
*
* C-C increased from 12 to 15
* Z is average of EQ
* B is average of ND
* match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
*/
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int  _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},

```

```

/* N */ { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */ { _M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */ { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */ { -2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */ { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */ { -6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ { -3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */ { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
#define DJNS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};

```

```

};                                     /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int      score;          /* score at last jmp */
    long     offset;        /* offset of prev block */
    short    ijmp;          /* current jmp index */
    struct jmp jp;          /* list of jmps */
};

struct path {
    int      spc;           /* number of leading spaces */
    short    n[JMPs];      /* size of jmp (gap) */
    int      x[JMPs];      /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char        *ofile;        /* output file name */
char        *namex[2];     /* seq names: getseqs() */
char        *prog;         /* prog name for err msgs */
char        *seqx[2];      /* seqs: getseqs() */
int         dmax;          /* best diag: nw() */
int         dmax0;         /* final diag */
int         dna;           /* set if dna: main() */
int         endgaps;       /* set if penalizing end gaps */
int         gapx, gapy;     /* total gaps in seqs */
int         len0, len1;     /* seq lens */
int         ngapx, ngapy;   /* total size of gaps */
int         smax;          /* max score: nw() */
int         *xbm;          /* bitmap for matching */
long        offset;        /* current offset in jmp file */
struct diag *dx;           /* holds diagonals */
struct path pp[2];         /* holds path for seqs */

char        *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char        *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                main
    int    ac;
    char   *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {

```

```

    fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
    fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
    fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
    fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
    fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
    exit(1);
}
namex[0] = av[1];
namex[1] = av[2];
seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

endgaps = 0;          /* 1 to penalize endgaps */
ofile = "align.out"; /* output file */

nw();      /* fill in the matrix, get the possible jmps */
readjmps(); /* get the actual jmps */
print();   /* print stats, alignment */

cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely; /* keep track of dely */

```

nw


```

int         ndelx, delx;    /* keep track of delx */
int         *tmp;          /* for swapping row0, row1 */
int         mis;           /* score for each type */
int         ins0, ins1;    /* insertion penalties */
register    id;            /* diagonal index */
register    ij;            /* jmp index */
register    *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
register    xx, yy;        /* index into seqs */

dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

smax = -10000;
if (endgaps) {
    for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
        ndely[yy] = yy;
    }
    col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
}
else
    for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
        dely[yy] = -ins0;

/* fill in match matrix
*/
for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
    /* initialize first entry in col
    */
    if (endgaps) {

```

```

    if (xx == 1)
        col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
    else
        col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
    ndelx = xx;
}
else {
    col1[0] = 0;
    delx = -ins0;
    ndelx = 0;
}

                                                                    ...nw
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);

```

```

        ndely[yy] = 1;
    } else
        ndely[yy]++;
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongong del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

...NW

id = xx - yy + len1 - 1;

```

```

if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
}

```

```

        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col
            */
            if (endgaps)
                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
            if (col1[yy] > smax) {
                smax = col1[yy];
                dmax = id;
            }
        }
    }
    if (endgaps && xx < len0)
        col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
    if (col1[yy-1] > smax) {
        smax = col1[yy-1];
        dmax = id;
    }
    tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)de1y);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);    }

/*
*
* print() -- only routine visible outside this module
*
* static:
* getmat() -- trace back best path, count matches: print()
* pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
* dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
* nums() -- put out a number line: dumpblock()
* putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
* stars() -- put a line of stars: dumpblock()
* stripname() -- strip any path and prefix from a seqname

```

```

*/

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print() print
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;

```

```

        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int    lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int    firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */
{
    int        nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char        outx[32];
    double      pct;
    register    n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;

```

```

while ( *p0 && *p1 ) {
    if (siz0) {
        p1++;
        n1++;
        siz0--;
    }
    else if (siz1) {
        p0++;
        n0++;
        siz1--;
    }
    else {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm++;
        if (n0++ == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0++];
        if (n1++ == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1++];
        p0++;
        p1++;
    }
}

/* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
if (endgaps)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```



```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static    nm;           /* matches in core -- for checking */
static    lmax;        /* lengths of stripped file names */
static    ij[2];       /* jmp index for a path */
static    nc[2];       /* number at start of current line */

```

```

static      ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];        /* ptr to current element */
static char *po[2];        /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()                                pr_align
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register      i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];      }

    for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {                                ...pr_align
        for (i = more = 0; i < 2; i++) {
            /*
             * do we have more of this sequence?
             */
            if (!*ps[i])
                continue;

```

```

more++;

if (pp[i].spc) { /* leading space */
    *po[i]++ = ' ';
    pp[i].spc--;
}
else if (siz[i]) { /* in a gap */
    *po[i]++ = '-';
    siz[i]--;
}
else { /* we're putting a seq element
    */
    *po[i] = *ps[i];
    if (islower(*ps[i]))
        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
    po[i]++;
    ps[i]++;

    /*
    * are we at next gap for this seq?
    */
    if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
        /*
        * we need to merge all gaps
        * at this location
        */
        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
            siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
    }
    ni[i]++;
}
}
if (++nn == olen || !more && nn) {
    dumpblock();
}

```

```

        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                dumpblock
{
    register    i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';

    =

    ...dumpblock

    (void) putc('\n', fx);
    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i] != ' ')) {
            if (i == 0)
                nums(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                stars();
            putline(i);
            if (i == 0 && *out[1])
                fprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                nums(i);
        }
    }
}

```

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                     nums
{
    int    ix;    /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register    i, j;
    register char    *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix], *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

```

```

/*
 * put out a line (name, [num], seq, {num}): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
{
    int ix;

    int i;                                  ...putline
    register char *px;

    for (px = name[ix], i = 0; *px && *px != '!'; px++, i++)
        (void) putc(*px, fx);
    for (; i < lmax+P_SPC; i++)
        (void) putc(' ', fx);

    /* these count from 1:
     * ni[] is current element (from 1)
     * nc[] is number at start of current line
     */
    for (px = out[ix]; *px; px++)
        (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                    stars
{
    int i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

```

```

if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
    !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
    return;
px = star;
for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
    *px++ = ' ';

for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

        if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A']) {
            cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '!';
        else
            cx = ' ';

    }
    else
        cx = ' ';
    *px++ = cx;
}
*px++ = '\n';
*px = '\0';
}

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static

```

```

stripname(pn)                                stripname
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjimps() -- get the good jimps, from tmp file if necessary
 * writejimps() -- write a filled array of jimps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* tmp file for jimps */
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                cleanup

```



```

    int    i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                                getseq
    char *file; /* file name */
    int *len; /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int     natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);

```

```

        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

    ..getseq

    py = pseq + 4;
    *len = tlen;
    rewind(fp);

    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
            if (index("ATGCU", *(py-1)))
                natgc++;
        }
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

```

```

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                readjmps
{
    int          fd = -1;
    int          siz, i0, i1;
    register     i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

            ...readjmps

            if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            }
        }
    }
}

```

```

        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) {          /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) {    /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
}

```

```

        else
            break;
    }

/* reverse the order of jmps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}

/*
* write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
*/
writejmps(ix)                                writejmps
{
    int    ix;

    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }

        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

[0070]

El término "vector", como se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido

nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se han ligado segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma vírico. Ciertos vectores pueden replicarse autónomamente en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente ligados. Tales vectores se denominan en este documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores recombinantes”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector.

[0071] “Polinucleótido”, o “ácido nucleico”, como se usan indistintamente en este documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse además después de la síntesis tal como conjugación con una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “tapas”, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), además de formas sin modificar del (de los) polinucleótido (s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. Los OH del extremo 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de remate orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato está sustituido con P (O)S (“tioato”), P (S)S (“ditioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P (O)R, P (O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos citados en este documento, que incluyen ARN y ADN.

[0072] “Oligonucleótido”, como se usa en este documento, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y completamente aplicable a oligonucleótidos.

[0073] Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se ha determinado por el procedimiento de Lowry, y lo más preferiblemente a más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna usando un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o preferentemente con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, generalmente, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

[0074] El término “numeración de residuos del dominio variable como en Kabat” o “numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat” y variaciones de los mismos se refiere al sistema de numeración usado para dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Usando esta numeración, la presente secuencia de aminoácidos lineal puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo de FR de la cadena pesada 82. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “convencional”. A menos que se indique de otro modo, la numeración de todas las posiciones de aminoácidos en el presente documento es según el sistema de numeración de Kabat.

[0075] Una “región estructural consenso humana” es una región estructural que representa el residuo de aminoácidos que se produce más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias del dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y col. En una realización, para VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y col.

[0076] Una “región estructural consenso del subgrupo III de VH” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III de la cadena pesada variable de Kabat y col. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 46)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 47)-H2-RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 48)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49).

[0077] Una “región estructural consenso del subgrupo I de VL” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I de la cadena ligera kappa variable de Kabat y col. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo I de VL comprende al menos una porción o todas de cada una de las siguientes secuencias:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTC (SEQ ID NO:50)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:51)-L2-GVPSRFGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:52)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:53).

[0078] El término “factor de crecimiento de hepatocitos” o “HGF”, como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específicamente o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido de HGF nativo o variante (tanto si se produce naturalmente como sintético) que puede activar la ruta de señalización HGF/c-met en condiciones que permiten que se produzca tal proceso. El término “HGF natural” generalmente se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína de HGF que se produce naturalmente. El término “secuencia de HGF natural” se refiere generalmente a una secuencia de aminoácidos encontrada en un HGF que se produce naturalmente.

[0079] Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe en mayor detalle en este documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

[0080] “Fragmentos de anticuerpos” comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, retiene la capacidad para unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC y unión al

complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo tal puede comprender sobre el antígeno el brazo de unión ligado a una secuencia de Fc que puede conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

5

[0081] El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente
10 específicos, estando dirigidos contra un único antígeno. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno.

[0082] Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos”
15 en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la (s) cadena (s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n° 4.816.567; y
20 Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 - 6855 (1984)).

[0083] Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del
25 receptor están sustituidos con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar
30 adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc),
35 normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., Nature 321: 522 - 525 (1986); Riechmann y col., Nature 332: 323 - 329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 - 596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en su interior: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105 - 115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035 - 1038 (1995); Hurlé y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428 - 433 (1994).
40

[0084] Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se ha desvelado en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.
45

[0085] Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella (s) alteración (alteraciones). Anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se
50 producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. Bio/Technology 10: 779 - 783 (1992) describe la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de residuos de CDR y/o de regiones estructurales se describe por: Barbas y col. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809 - 3813 (1994); Schier y col. Gene 169: 147 - 155 (1995); Yelton y col. J. Immunol. 155: 1994 - 2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154 (7): 3310 - 9 (1995); y Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226: 889 - 896 (1992).
55

[0086] Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Anticuerpos bloqueantes o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0087] Un “anticuerpo agonista”, como se usa en este documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.
60

[0088] Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia / molécula o

procedimiento de la invención. Éste incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos que van a tratarse en este documento incluyen tumores malignos y benignos; no leucemias y tumores malignos linfoides; trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros relacionados con la angiogénesis.

[0089] Los términos “trastorno proliferativo de células” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados a algún grado de proliferación de células anormales. En una realización, el trastorno proliferativo de células es cáncer.

[0090] “Tumor”, como se usa en este documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo de células”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente exclusivos como se denomina en este documento.

[0091] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento / proliferación celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0092] La desregulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que pueden tratarse por composiciones y procedimientos de la invención. Estos trastornos incluyen tanto afecciones no neoplásicas como neoplásicas. Las neoplásicas incluyen, pero no se limitan a, aquellas descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen, pero no se limitan a, hipertrofia no deseada o anormal, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas psoriásicas, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías diabéticas y otras proliferativas que incluyen retinopatía de la prematuridad, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular senil, edema macular diabético, neovascularización de la córnea, neovascularización por injerto de córnea, rechazo de injerto de córnea, neovascularización retiniana / coroidea, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante de córnea y otro tejido, inflamación crónica, inflamación de pulmón, lesión pulmonar aguda / SDA, septicemia, hipertensión pulmonar primaria, derrames pulmonares malignos, edema cerebral (por ejemplo, asociado a accidente cerebrovascular agudo / lesión cerrada en la cabeza / traumatismo), inflamación sinovial, formación de paño en AR, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, poliquistosis ovárica, endometriosis, tercer espacio de enfermedades de fluidos (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad intestinal), fibroides uterinos, parto prematuro, inflamación crónica tal como EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto renal, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido no deseada o anómala (no cáncer), articulaciones hemofilicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento de pelo, síndrome de Osler-Weber, granuloma piogénico, fibroplasias retrolentales, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (tal como el asociado a pericarditis) y derrame pleural.

[0093] Una “enfermedad autoinmunitaria” en este documento es una enfermedad o trastorno no maligno que se produce a partir de y va dirigida contra los propios tejidos de un individuo. Las enfermedades autoinmunitarias en este documento excluyen específicamente enfermedades o afecciones malignas o cancerosas, excluyendo especialmente linfoma de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas y leucemia mieloblástica crónica. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias o trastornos incluyen, pero no se limitan a, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia y esclerosis sistémica; respuestas asociadas a enfermedad inflamatoria del intestino (tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome disneico (incluyendo síndrome disneico del adulto; SDA); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma y otras afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de la adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus de tipo I o diabetes mellitus dependiente de insulina); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmunitaria; encefalomiénelitis alérgica; síndrome de Sjörgen; diabetes juvenil; y respuestas inmunitarias asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T normalmente encontrados en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades

que implican diapédesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (CNS); síndrome por lesión multiorgánica; anemia hemolítica (que incluye, pero no se limita a, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia grave; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad anti-membrana basal glomerular; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; pénfigo buloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad de Reiter; síndrome de la persona rígida; enfermedad de Behçet; arteritis de células gigantes; nefritis de complejos inmunes; nefropatía por IgA; polineuropatías por IgM; púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) o trombocitopenia autoinmune, etc.

[0094] Como se usa en este documento, “tratamiento” se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula que está tratándose, y puede realizarse tanto para la profilaxis como durante el curso de la patología clínica. Efectos del tratamiento deseables incluyen prevención de la manifestación o reaparición de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

[0095] Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

[0096] Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia / molécula de la invención, agonista o antagonista, puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia / molécula de la invención, agonista o antagonista, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia / molécula de la invención, agonista o antagonista, es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en un estadio temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0097] El término “agente citotóxico” como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce destrucción de células. Está previsto que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas, fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos desvelados más adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida produce la destrucción de células tumorales.

[0098] Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapacol; colcicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calmenteostatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183 - 186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enediína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposomas de HCl de doxorubicina (DOXIL®) y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, porfiromicina, puomicina, quelamicina,

rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); rizoquina; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; además de combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0099] En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y están frecuentemente en forma de tratamiento sistémico, o del cuerpo completo. Pueden ser las propias hormonas. Ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); antagonistas de receptores de estrógenos como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que funcionan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4 (5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico / zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (ARELIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); además de troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (LURTOTECAN®); rnrh (por ejemplo, ABARELIX®); ditosilato de lapatinib (un inhibidor de moléculas pequeñas de tirosina cinasa dual ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); inhibidores de la COX-2 tales como celecoxib (CELEBREX®); 4- (5- (4-metilfenil)-3- (trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) bencenosulfonamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0100] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende de la activación de HGF/c-Met tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes de HGF/c-Met en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S), tal como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel)

son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos previniendo la despolimerización, que produce la inhibición de la mitosis en células.

5

[0101] “Doxorubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8- (hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

10 Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

[0102] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que vaya a usarse. Generalmente, las células huésped preferidas son de origen tanto procarionta como eucariota (generalmente de mamífero).

20 Generación de anticuerpos usando células huésped procariontas:

Construcción de vectores

[0103] Las secuencias de polinucleótidos que codifican componentes de polipéptido del anticuerpo de la invención pueden obtenerse usando técnicas convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante que puede replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariontas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica pueden usarse con el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que van a insertarse en el vector y de la célula huésped particular que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0104] En general, los vectores de plásmido que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan a propósito de estos huéspedes. El vector generalmente lleva un sitio de replicación, además de marcar las secuencias que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófago también puede contener, o modificarse para contener, promotores que pueden ser usados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter y col., patente de EE.UU. nº 5.648.237.

[0105] Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como vectores transformantes a propósito de estos huéspedes. Por ejemplo, el bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 puede utilizarse en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células huésped susceptibles tales como LE392 de *E. coli*.

[0106] El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón que codifican cada uno los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora sin traducir localizada en la dirección 5' con respecto a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariontas normalmente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles elevados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

60

[0107] Son muy conocidos un gran número de promotores reconocidos mediante una variedad de posibles células huésped. El promotor seleccionado puede estar operativamente ligado a ADN de cistrón que codifica la

cadena ligera o pesada eliminando el promotor de la fuente ADN por una digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado con respecto al promotor de polipéptido diana nativo.

[0108] Promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo así que un experto los ligue operablemente a cistrones que codifican las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist y col. (1980) Cell 20: 269) usando ligadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

[0109] En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de la secreción que dirige la translocalización de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada con el fin de la presente invención debería ser una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal está sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en los conductores de fosfatasa alcalina, penicilinas, *lpp* o enterotoxina estable al calor II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

[0110] En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede producirse en el citoplasma de la célula huésped y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. En ese aspecto, las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas *trxB* de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiéndose así el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades de proteína expresada. Proba y Plückthun Gene, 159: 203 (1995).

[0111] La presente invención proporciona un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes de polipéptido expresados puede modularse con el fin de maximizar el rendimiento de anticuerpos secretados y apropiadamente ensamblados de la invención. Tal modulación se lleva a cabo al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas de traducción para los componentes de polipéptido.

[0112] Una técnica para modular la fuerza de traducción se desvela en Simmons y col., patente de EE.UU. n° 5.840.523. Se utilizan variantes de la región de iniciación de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada puede crearse una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos con un intervalo de fuerzas de traducción, proporcionándose así un medio conveniente por el cual se ajusta este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR pueden generarse por técnicas de mutagénesis convencionales que producen cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o la separación de las secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un procedimiento para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al principio de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede llevarse a cabo cambiando la tercera posición de los nucleótidos de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos tales como leucina, serina y arginina tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la preparación del banco. Este procedimiento de mutagénesis se describe en detalle en Yansura y col. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151 - 158.

[0113] Preferentemente, un conjunto de vectores se genera con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón en su interior. Este conjunto limitado proporciona una comparación de niveles de expresión de cada cadena, además del rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo diversas combinaciones de fuerzas de TIR. Las fuerzas de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons y col., patente de EE.UU. n° 5.840.523. Basándose en la comparación de fuerzas de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vector de expresión de la invención.

[0114] Células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen

Archaeobacteria y *Eubacteria*, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización se usan células Gram-negativas. En una realización se usan células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190 - 1219; depósito de ATCC n° 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac lq lacL8 $\Delta ompT$ ($\Delta nmpc-fepE$) degP41 kan^R* (patente de EE.UU. n° 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), B de *E. coli*, λ 1776 de *E. coli* (ATCC 31.537) y RV308 de *E. coli* (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. Los procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass y col., Proteins, 8: 309 - 314 (1990). Es generalmente necesario seleccionar bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse adecuadamente especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* como huésped cuando se usan plásmidos muy conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inhibidores de proteasas adicionales pueden incorporarse deseablemente en el cultivo celular.

20 Producción de anticuerpos

[0115] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las secuencias deseadas.

25

[0116] Transformación significa introducir ADN en el huésped procarionta de manera que el ADN sea replicable, tanto como un elemento extracromosómico como por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio es generalmente usado para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de las paredes celulares. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol / DMSO. Todavía otra técnica usada es la electroporación.

30

[0117] Las células procariontas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más complementos nutritivos necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contiene un agente de selección elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariontas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan gen de resistencia a ampicilina.

35

[0118] También puede incluirse cualquier complemento necesario, además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, a concentraciones apropiadas introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneitol y ditioneitol.

40

[0119] Las células huésped procariontas se cultivan a temperatura adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida oscila de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que oscile de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente aproximadamente 7,0.

50

[0120] Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante con fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons y col., J. Immunol. Methods (2002), 263: 133 - 147). Puede usarse una variedad de otros inductores según la construcción de vectores empleada, como se conoce en la técnica.

60

[0121] En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención son secretados en y recuperados del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas normalmente implica romper el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las

células, el residuo de células o las células completas pueden eliminarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. Alternativamente, las proteínas pueden transportarse en los medios de cultivo y aislarse en su interior. Las células pueden eliminarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo filtrarse y concentrarse para más purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse adicionalmente e identificarse usando procedimientos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

[0122] En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad por un proceso de fermentación. Diversos procesos de fermentación de lotes alimentados a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan hélices agitadoras para distribuir el oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono / energía preferida). Fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica y puede oscilar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

[0123] En un proceso de fermentación, la inducción de expresión de proteínas es normalmente iniciada después de que las células se hayan cultivado bajo condiciones adecuadas a una densidad deseada, por ejemplo, una DO_{550} de aproximadamente 180 - 220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una variedad de inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12 - 50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

[0124] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, vectores adicionales que expresan en exceso proteínas de chaperona tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) pueden usarse para co-transformar las células procariontas huésped. Se ha demostrado que las proteínas de chaperona facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen y col. (1999) J Bio Chem 274: 19601 - 19605; Georgiou y col., patente de EE.UU. n° 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE.UU. n° 6.027.888; Bothmann y Plückthun (2000) J. Biol. Chem 275: 17100 - 17105; Ramm y Plückthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106 - 17113; Arie y col. (2001) Mol. Microbiol. 39: 199 - 210.

[0125] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas pueden usarse para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutación (mutaciones) genética (s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes para proteasas de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly y col. (1998), arriba; Georgiou y col., patente de EE.UU. n° 5.264.365; Georgiou y col., patente de EE.UU. n° 5.508.192; Hara y col., Microbial Drug Resistance, 2: 63 - 72 (1996).

[0126] En una realización, las cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que expresan en exceso una o más proteínas de chaperona se usan como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

Purificación de anticuerpos

[0127] En una realización, la proteína de anticuerpos producida en este documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse los procedimientos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre columnas de inmovoafinidad o intercambio de iones, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

[0128] En un aspecto, la proteína A inmovilizada sobre una fase sólida se usa para la purificación por inmovoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de anticuerpos. Lindmark y col. (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1 - 13. La fase sólida a la que la proteína A se inmoviliza es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna

de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna ha sido recubierta con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

[0129] Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente se aplica sobre la proteína A inmovilizada sobre la fase sólida para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. Entonces, la fase sólida se lava para eliminar contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

10 Generación de anticuerpos usando células huésped eucariotas:

[0130] Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

15

(i) Componente de secuencia señal

[0131] Un vector para su uso en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, además de conductores secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

20

[0132] El ADN para tal región precursora está ligado en el marco de lectura con el ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

[0133] Generalmente, un componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente sólo debido a que contiene el promotor temprano.

30

(iii) Componente de gen de selección

35

[0134] Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sean relevantes, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

40

[0135] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son satisfactoriamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, por tanto, sobrevive a la pauta de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

45

[0136] Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para la captación del ácido nucleico de anticuerpo, tal como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

50

[0137] Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR son primero identificadas cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

55

[0138] Alternativamente, células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR natural y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. n° 4.965.199.

60

(iv) Componente de promotor

[0139] Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente ligado al ácido nucleico del polipéptido del anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases en la dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias están adecuadamente insertadas en vectores de expresión eucariotas.

10

[0140] La transcripción de polipéptidos de anticuerpos de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0141] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de EE.UU. nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. nº 4.601.978. Véase también Reyes y col., Nature 297: 598 - 601 (1982) sobre la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, como promotor puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(v) Componente de elemento potenciador

[0142] La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores aumenta frecuentemente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17 - 18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante de polipéptidos del anticuerpo, pero está preferentemente localizado en un sitio 5' desde el promotor.

40 (vi) Componente de terminación de la transcripción

[0143] Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas también contendrán normalmente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones sin traducir de 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariotas o víricos o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/1102 y el vector de expresión desvelado en su interior.

50 (vii) Selección y transformación de células huésped

[0144] Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en este documento incluyen células eucariotas superiores descritas en este documento, que incluyen células huésped de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod 23: 243 - 251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci.

383: 44 - 68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0145] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de células huésped

10 **[0146]** Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem, 102: 255 (1980), las patentes de EE.UU. n° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 15 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto habitual en la técnica.

25

(ix) Purificación de anticuerpo

[0147] Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo 30 particulado, tanto células huésped como fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran generalmente primero usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de las anteriores etapas para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir 35 el crecimiento de contaminantes fortuitos.

[0148] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de 40 la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., J. Immunol. Meth. 62: 1 - 13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es lo más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como 45 vidrio de poro controlado o poli (estirenodivinil)benceno permiten flujos de velocidad más rápida y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, 50 cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

[0149] Tras cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los 55 contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 - 4,5, realizado preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal de aproximadamente 0 - 0,25 M).

Ensayos de actividad

60

[0150] Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas / químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

[0151] Las inmunoglobulinas purificadas pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del extremo N, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) por exclusión de tamaño no desnaturizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

[0152] En ciertas realizaciones de la invención, las inmunoglobulinas producidas en este documento se analizan para su actividad biológica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la presente invención se prueban para su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en este documento incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de unión directo o competitivo que use técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Un ensayo de unión a antígeno ilustrativo se proporciona más adelante en la sección de ejemplos.

[0153] En una realización, la presente invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas funciones efectoras, pero no todas, que hacen que sea un candidato deseado para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante; sin embargo, ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc de la inmunoglobulina producida se miden para garantizar que sólo se mantengan las propiedades deseadas. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden realizarse para confirmar la reducción / agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) pueden realizarse para garantizar que el anticuerpo carece de unión a Fc γ R (de ahí que probablemente carezca de actividad de ADCC), pero retiene capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, las células NK, sólo expresan Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457 - 92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de EE.UU. n° 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. *PNAS* (USA) 95: 652 - 656 (1998). Los ensayos de unión a C1q también pueden llevarse a cabo para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y de ahí que carezca de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996). Las determinación de la unión a FcRn y la eliminación / semivida *in vivo* también pueden realizarse usando procedimientos conocidos en la técnica.

Anticuerpos humanizados

[0154] La presente invención engloba anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos de "importación", que se toman normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) *Nature* 321: 522 - 525; Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323 - 327; Verhoeven y col. (1988) *Science* 239: 1534 - 1536) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de un especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0155] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901. Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta y col. (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623.

[0156] Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento, anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno (s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno.

15 Variantes de anticuerpo

[0157] En un aspecto, el anticuerpo puede comprender modificaciones en la superficie de separación de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en el que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, siendo la protuberancia posicionable en la cavidad de manera que se promueva la complejación del primer y segundo polipéptidos de Fc. Los procedimientos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.731.168.

[0158] Se contemplan modificación (modificaciones) de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se hace para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento de producirse la secuencia.

[0159] Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son las localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Well (1989) Science, 244: 1081 - 1085. Aquí se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Entonces, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el barrido de ala o la mutagénesis al azar se realiza en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se criban para la actividad deseada.

[0160] Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones secuencia dentro de la secuencia de un único o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

[0161] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "Sustituciones preferidas". Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces cambios más sustanciales, denominados "Sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describen adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, pueden introducirse y cribarse los productos.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr; (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

[0162] Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pág. 73 - 75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

10

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares sin carga: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

15

[0163] Alternativamente, los residuos que se produce naturalmente pueden dividirse en grupos basándose en propiedades de cadenas laterales comunes:

20

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de cadenas: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

25

[0164] Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los restantes sitios (no conservados).

30

[0165] Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la (s) variante (s) resultante (s) seleccionada (s) para el desarrollo posterior tendrá (n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6 - 7 sitios) se maduran para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Por tanto, los anticuerpos generados se expresan en partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto génico III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en este documento. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, la mutagénesis por barrido de alanina puede realizarse para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-

40

anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en este documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en este documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

[0166] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una versión de variante o de no variante anteriormente preparada del anticuerpo.

[0167] Puede desearse introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc del polipéptido de inmunoglobulina de la invención, generándose así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

[0168] Según esta descripción y las enseñanzas de la materia, se contempla que un anticuerpo usado en los procedimientos descritos en el presente documento pueda comprender una o más alteraciones con respecto al anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos retendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica con respecto a su homólogo natural. Por ejemplo, se cree que pueden hacerse ciertas alteraciones en la región Fc que producirían unión de C1q alterada (es decir, tanto mejorada como disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322: 738 - 40 (1988); patente de EE.UU. n° 5.648.260; patente de EE.UU. n° 5.624.821; y documento WO94/29351 referente a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

30 Inmunoconjugados

[0169] En el presente documento también se describen inmunoconjugados, o conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un origen radioconjugado).

[0170] El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605 - 614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151 - 172; la patente de EE.UU. 4.975.278) permite teóricamente la elección de tumores como diana por el resto de fármaco, y la acumulación intracelular en su interior, en el que la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales, además de las células tumorales buscadas para ser eliminadas (Baldwin y col., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603 - 05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, A. Pinchera y col. (ed.s), pág. 475 - 506). Así se busca la eficacia máxima con toxicidad mínima. Se ha informado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183 - 87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland y col., (1986) arriba). Las toxinas usadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de las plantas tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler y col. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92 (19): 1573 - 1581; Mandler y col. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025 - 1028; Mandler y col. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786 - 791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu y col., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618 - 8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman y col. (1993) *Cancer Res.* 53: 3336 - 3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas grandes.

[0171] ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murina dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y unido al radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y por un ligador-quelante de tiourea (Wiseman y col. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27 (7): 766 - 77; Wiseman y col. (2002) *Blood* 99 (12): 4336 - 42; Witzig

y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (10): 2453 - 63; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (15): 3262 - 69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (ozogamicina de gemtuzumab, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo CD33 humano ligado a caliqueamicina, fue autorizado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs in the Future (2000) 25 (7): 686; patentes de EE.UU. n° 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo C242 humano ligado por el ligador de disulfuro SPP al resto del fármaco maitansinoide, DM1, está avanzando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) ligado al resto del fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina y col. (2003) Nature Biotechnology 21 (7): 778 - 784) y están en desarrollo terapéutico.

[0172] Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunocombinados se han descrito anteriormente. La toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis- (p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metilidietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0173] En este documento también se contemplan conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

40 Maitansina y maitansinoides

[0174] Un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) de la invención puede conjugarse con una o más moléculas de maitansinoide.

[0175] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. n° 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. n° 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

[0176] En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunocombinados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618 - 8623 (1996) describieron inmunocombinados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado con el anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52: 127 - 131 (1992) describen inmunocombinados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un ligador de disulfuro al anticuerpo A7 murino que se une a un antígeno sobre líneas de

células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Conjugados de anticuerpo-maitansinoide (inmunoconjugados)

10 **[0177]** Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de tanto el anticuerpo como la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3 - 4 moléculas de maitansinoide conjugado por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina / anticuerpo potenciara la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones de no patente citadas anteriormente en este documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

15
20 **[0178]** Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para la preparación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los desvelados en la patente de EE.UU. n° 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, y Chari y col., Cancer Research 52: 127 - 131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles de ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o grupos lábiles de esterasa como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter.

25 **[0179]** Los conjugados de anticuerpo y maitansinoide pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3- (2-piridilditio)propionato (SPDP), 4- (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis- (p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3- (2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173: 723 - 737 [1978]) y N-succinimidil-4- (2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

30 **[0180]** El ligador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

45 Caliqueamicina

[0181] Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de EE.UU. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman y col., Cancer Research 53: 3336 - 3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58: 2925 - 2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelular y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes por la internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

60 Otros agentes citotóxicos

[0182] Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE.UU.

5.877.296).

[0183] Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecnos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

10 **[0184]** La presente invención contempla adicionalmente un inmunoc conjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

[0185] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0186] Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49 - 57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

30 **[0187]** Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3- (2-piridilditio)propionato (SPDP), 4- (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis- (p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52: 127 - 131 (1992); patente de EE.UU. n° 5.208.020).

[0188] Los compuestos de la invención pueden ser, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de ligador cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil- (4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.). Véanse las páginas 467 - 498, 2003 - 2004 Applications Handbook and Catalog.

50 Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

[0189] En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), un anticuerpo (Ab) está conjugado con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, mediante un ligador (L). El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de ligador bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo ligador de bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo.

60



[0190] Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii)

grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de ligador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol.

[0191] Los conjugados de anticuerpo-fármaco también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de ligador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos o restos de ligador de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glicosilado con tanto galactosa oxidasa como meta-peryodato de sodio pueden dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3: 138 - 146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo ligador.

[0192] Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

[0193] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0194] En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Derivados de anticuerpos

[0195] Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol / propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli (alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno / anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros al azar) y dextrano o poli (n-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno / óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli (alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificada o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el anticuerpo derivado se usará o no en una terapia en condiciones definidas, etc.

60 Formulaciones farmacéuticas

[0196] Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o

- estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de disoluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido
- 5 ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina,
- 10 arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).
- 15 **[0197]** La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.
- 20 **[0198]** Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsula de poli- (metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed.
- 25 (1980).
- [0199]** Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza por filtración a través de membranas de filtración estériles.
- 30 **[0200]** Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli (alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de
- 35 ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D- (-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Si las inmunoglobulinas encapsuladas
- 40 siguen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de
- 45 disolución ácida, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.
- [0201]** En ciertos casos, un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico se administra al paciente. En algunos casos, el inmunoconjugado y/o antígeno al que está unido es / son
- 50 internalizado (s) por la célula, produciéndose un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la destrucción de la célula diana a la que se une. En un caso, el agente citotóxico elige como diana o interfiere con ácido nucleico en la célula diana. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos observados en este documento (tales como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radiactivo o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.
- 55 **[0202]** Los anticuerpos de la invención pueden usarse tanto solos como en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con otro anticuerpo, agente (s) quimioterapéutico (s) (incluyendo mezclas de agentes quimioterapéuticos), otro (s) agente (s) citotóxico (s), agente (s) antiangiogénico (s), citocinas y/o agente (s) inhibidor (es) del crecimiento. Si un anticuerpo
- 60 de la invención inhibe el crecimiento tumoral, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o varios agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento tumoral. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede combinarse con anticuerpos anti-VEGF que bloquean actividades de VEGF y/o anticuerpos anti-ErbB (por ejemplo, anticuerpo anti-HER2 HERCEPTIN®) en un tratamiento de cáncer de mama metastásico. Alternativamente, o

adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo, irradiación con haces externos o terapia con un agente marcado radiactivo tal como un anticuerpo). Tales terapias combinadas observadas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes están incluidos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes de, y/o tras, la administración de la terapia o terapias complementarias.

[0203] El anticuerpo de la invención (y agente terapéutico complementario) se administra (n) por cualquier vía adecuada, que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0204] La composición de anticuerpo de la invención se formulará, dosificará y administrará en un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los médicos generales. El anticuerpo no necesita estar formulado, pero está opcionalmente formulado, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores tratados anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se usan anteriormente en este documento o aproximadamente del 1 al 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

[0205] Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros agentes tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, el tipo de anticuerpo, la gravedad y transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra o no para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg - 10 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) puede administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de forma que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia es fácilmente monitorizada por técnicas y ensayos convencionales.

Artículos de fabricación

[0206] En otro aspecto se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma, o cuando se combina con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende otro agente citotóxico. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones de anticuerpo pueden usarse para tratar una afección particular, por ejemplo,

cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

[0207] Lo siguiente son ejemplos de los procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que diversas otras realizaciones pueden ponerse en práctica, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

10 **EJEMPLOS**

Materiales y procedimientos

Reactivos

15

[0208] El inhibidor de tripsina de maíz fue de Haematologic Technologies (Essex Junction, VT) y el sustrato cromogénico para HGFA, Spectrozyme® fVIIa, fue de American Diagnostica (Stamford, CT). Se expresó sHAI-1B soluble (sHAI-1B) en células de ovario de hámster chino y se purificó como se ha descrito previamente (1). El inhibidor del dominio de Kunitz IV-49C se ha descrito previamente (2) (Genentech, Inc., South San Francisco). Se expresó HGFA recombinante humano (HGFA) en un sistema de expresión de baculovirus como se ha descrito previamente (1).

20

Ensayos de activación de proHGF

25

[0209] Los ensayos de activación de proHGF y el marcado de proHGF con Iodogen se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (1, 3). Brevemente, HGFA se preincubó con anticuerpos anti-HGFA o sHAI-1B en tampón HNC (Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM) durante 15 min a temperatura ambiente, después de lo cual se añadió proHGF marcado con ¹²⁵I en tampón HNC y se incubó durante 4 h a 37 °C. Las concentraciones de reactivo en la mezcla final fueron del siguiente modo: HGFA 2 nM, 0,05 mg/ml de proHGF marcado con ¹²⁵I, 0,1 mg/ml de anticuerpos anti-HGFA, sHAI-1B 1 µM. Después de 4 h se tomaron alícuotas y se añadieron a tampón de muestra (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con el agente reductor ditiotreitól (BIO-Rad). Después de un breve calentamiento, las muestras (aprox. 10⁶ cpm/carril) se cargaron sobre un gen de poliacrilamida en gradiente del 4 - 20 % (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Después de la electroforesis, los geles secados se expusieron sobre películas de rayos X (X-OMAT AR, Eastman Kodak Company, Rochester, NY) durante 10 - 20 min. Las películas se revelaron (procesador Kodak M35A X-OMAT), se barrieron (Umax S-12, Umax Data Systems, Inc., Fremont, CA) y se procesaron adicionalmente con el software Adobe V.6.0 Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

30

35

Experimentos BIAcore

40

[0210] Las afinidades de unión de anticuerpos anti-HGFA por HGFA se determinaron por mediciones de resonancia de plasmones superficiales en un instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Inc.) La IgG1 anti-HGFA de longitud completa reformateada se inmovilizó a una densidad de 300 unidades de resonancia (UR) sobre las celdas de flujo de un chip sensor Pioneer CM5. La inmovilización se logró por acoplamiento aleatorio mediante grupos amino usando un protocolo proporcionado por el fabricante. Los sensogramas se registraron para la unión de HGFA a estas superficies mediante inyección de una serie de disoluciones que oscilaban de 1 µM a 8 nM en incrementos de 2 veces. La señal de la celda de referencia se restó del sensograma observado. Las constantes cinéticas se calcularon por análisis de regresión no lineal de los datos según un modelo de unión de Langmuir 1: 1 usando software suministrado por el fabricante. En experimentos de competencia, HGFA (70 nM) se incubó previamente con diversas concentraciones de sHAI-1B (4 nM - 300 nM) o IV-49C (11 nM - 300 nM) o un ligador de sitios activos de HGFA de molécula pequeña (220 nM - 10 µM). Después de la incubación durante 60 min a temperatura ambiente, la mezcla enzima-inhibidor se inyectó en las celdas de flujo y se registraron los sensogramas.

45

50

Ensayo de inhibición de enzima de HGFA

55

[0211] Los anticuerpos o sHAI-1B se incubaron con HGFA (concentración final 5 nM) en tampón HBSA (Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 0,5 mg/ml de BSA, CaCl₂ 5 mM) durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadió Spectrozyme® fVIIa (conc. final 200 µM, K_M = 200 µM) y las velocidades lineales del aumento en absorbancia a 405 nm se midieron en un lector de microplacas cinético (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La inhibición de la actividad enzimática se expresó como actividad fraccionaria (v_i/v₀) de actividad sin inhibir.

60

Resultados y discusión

Identificación de anticuerpos anti-HGFA por expresión en fago

[0212] Un procedimiento de identificar anticuerpos es mediante el uso de una biblioteca de anticuerpos de fago. Véase, por ejemplo, Lee y col. (4). Para identificar anticuerpos contra HGFA, los presentes inventores llevaron a cabo cuatro rondas de inmunopurificación usando una biblioteca de anticuerpos de fagémido sintético humano previamente informada (una biblioteca de F (ab')₂). Las placas se recubrieron con 5 µg/pocillo de HGFA. Los presentes inventores aumentaron la rigurosidad de lavado después de cada ronda, de 10 - 40 veces de lavados. Los presentes inventores observaron enriquecimiento después de tres rondas de inmunopurificación. Después de cuatro rondas de inmunopurificación se recogieron 95 clones para ensayos de ELISA. Después de la secuenciación se encontró que 67 clones únicos se unían específicamente a HGFA. Después del ELISPOT competitivo, 24 clones se caracterizaron adicionalmente usando fago purificado para medir valores de CI₅₀, que se determinaron usando un ELISA competitivo de fagos convencional. 14 clones únicos con valores de CI₅₀ < 100 nM se subclonaron en el vector de IgG1 humana PRK. Las secuencias de CDR para estos clones se enumeran en la Fig. 1. Cadenas pesadas y ligeras (del anticuerpo para 4D5 humanizado como se describe en Lee y col. (4)) de clones anti-HGFA se co-transfectaron en células 293 de mamífero. Después de una semana se recogieron los sobrenadantes sin suero y los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad con proteína A.

Inhibición de la actividad enzimática de HGFA por anticuerpos anti-HGFA de longitud completa

[0213] Los anticuerpos seleccionados se reformatearon como anticuerpos de longitud completa (IgG) por técnicas recombinantes convencionales. Estos anticuerpos de longitud completa se examinaron en un ensayo de activación de sustrato macromolecular usando proHGF marcado con ¹²⁵I. Durante el experimento de 4 h, HGFA convirtió completamente proHGF en HGF bicatenario, y esta reacción podría inhibirse por sHAI-1B 1 µM (Fig. 2A) de acuerdo con informes previos (1). Con la excepción del anticuerpo n° 49 (Fig. 1), todos los anticuerpos anti-HGFA probados a la concentración de prueba de 0,67 µM inhibieron significativamente la conversión de proHGF (Fig. 2). Experimentos adicionales mostraron que n° 58 inhibió la conversión de proHGF a concentraciones de tan sólo 0,03 µM (Fig. 3). De acuerdo con estos resultados, el anticuerpo n° 58 inhibió muy potentemente la actividad enzimática de HGFA hacia el sustrato sintético pequeño Spectrozyme® fVIIa, que tiene una CI₅₀ de 1,3 nM, mientras que el anticuerpo n° 49 no se inhibió a 500 nM (Fig. 8). Además, de acuerdo con sus actividades inhibitoras relativamente más débiles en ensayos de activación de proHGF, los anticuerpos n° 39, n° 86, n° 90 y n° 95 tuvieron actividades comparablemente más débiles en el ensayo de sustrato cromogénico, que tiene CI₅₀ > 500 nM (Fig. 8). Los 3 anticuerpos n° 42, n° 61 y n° 74 también mostraron inhibición relativamente débil (CI₅₀ > 500nM) a pesar de la inhibición casi completa de la conversión de proHGF a 0,67 µM (Fig. 8). De forma interesante, el anticuerpo n° 75 mostró inhibición cinética inusual ya que su actividad inhibitora alcanzó una meseta a aproximadamente el 70 % de inhibición con respecto a la inhibición completa lograda por el anticuerpo n° 58 (Fig. 4).

Mecanismos inhibidores de anticuerpos n° 75 y n° 58

[0214] En vista de la inhibición completa del procesamiento del sustrato macromolecular por el anticuerpo n° 75, su incapacidad para neutralizar completamente la actividad enzimática de HGFA hacia el sustrato sintético pequeño sugirió que el anticuerpo n° 75 se une a una región de HGFA funcionalmente importante localizada fuera, o en proximidad a, el sitio activo. A diferencia, el anticuerpo n° 58 inhibió fuertemente tanto el procesamiento del sustrato macromolecular como del pequeño por HGFA. Para obtener más conocimiento detallado de los mecanismos inhibidores de anticuerpos se llevaron a cabo estudios de unión competitiva con diversos inhibidores de sitios activos conocidos. Los tres inhibidores de sitios activos de HGFA usados fueron el inhibidor del dominio de Kunitz Bi previamente descrito sHAI-1B (1), el inhibidor del dominio de Kunitz individual IV-49C (2) y el ligador de sitios activos de HGFA de molécula pequeña. IV-49C es un dominio de Kunitz de 62 aminoácidos derivado del inhibidor del precursor de proteína β (APPI) de Alzheimer y es un inhibidor específico del complejo factor tisular / factor VIIa (2). Los presentes inventores encontraron que IV-49C también es un potente inhibidor de actividad enzimática de HGFA, que tiene una CI₅₀ de 0,079 µM, mientras que el ligador de sitios activos de HGFA de molécula pequeña inhibió con una CI₅₀ de 0,8 µM (K_i = 0,4 µM) como se muestra en la Fig. 5.

[0215] La K_D de HGFA para el anticuerpo inmovilizado n° 58 fue 1,3 nM (Fig. 9), similar a la afinidad determinada por ensayos amidolíticos (Fig. 8). Las mediciones de BIACore mostraron que sHAI-1B, IV-49C y el ligador de sitios activos de HGFA de molécula pequeña inhibieron la unión de HGFA a n° 58. Esto sugirió que n° 58 se une tanto directamente al sitio activo de HGFA como ejerce influencias alostéricas sobre el sitio activo.

[0216] El anticuerpo n° 75 tuvo unión más débil a HGFA (Fig. 6E; Fig. 9) que n° 58. Además, el ligador de sitios activos de HGFA de molécula pequeña no tuvo efecto sobre la unión de HGFA al anticuerpo n° 75, que indica que el anticuerpo n° 75 no se une a la región 'central' del sitio activo. De forma interesante, el anticuerpo n° 75 inhibió parcialmente la actividad amidolítica de HGFA, sugiriendo que aún cuando el epítipo de n° 75 se encuentre fuera del sitio activo, debe haber un enlace molecular entre estos dos sitios. Esto explicaría los efectos parciales de sHAI-1B y IV-49C sobre la unión al anticuerpo n° 75 (Fig. 9; Fig. 6F, G).

[0217] Similar al anticuerpo nº 75, los dos anticuerpos nº 74 y nº 61 también se unieron a HGFA en presencia del ligador de sitios activos de molécula pequeña (Fig. 9), mientras que los inhibidores del dominio de Kunitz interfirieron con la unión a HGFA. Estos resultados sugirieron que los epítopes de nº 74 y nº 61 se encuentran fuera del sitio activo de HGFA. Es concebible que los anticuerpos nº 61, nº 74 y nº 75 se unan a una región de exosito de HGFA que es importante para la interacción del sustrato de macromolecular o que influyan alostéricamente en la conformación de la región de sitio activo. En el factor de serina proteasa VIIa estructuralmente relacionado, un exosito importante se localiza entre el sitio activo y el bucle de unión a calcio (5). Anticuerpos, además de péptidos que se unen al exosito del factor VIIa, son potentes inhibidores del procesamiento del sustrato macromolecular (6, 7). Por ejemplo, la unión del inhibidor peptídico E76 efectúa cambios conformacionales en uno de los bucles del 'dominio de activación', alterando así un sitio de interacción de sustrato (7). Además, estos cambios inducen efectos alostéricos en el sitio activo, que explica la observación de que el péptido E-76 inhiba la actividad amidolítica a pesar de la unión fuera de la región de sitio activo (7).

[0218] Experimentos de unión competitiva adicionales con los anticuerpos biotinilados nº 75 y nº 58 indicaron que nº 75 y nº 58 tienen epítopes solapantes sobre HGFA (datos no mostrados). Los estudios cinéticos de enzimas demostraron adicionalmente que nº 58 es un inhibidor competitivo y que nº 75 es un inhibidor competitivo parcial (es decir, inhibidor competitivo hiperbólico intersecante simple) (datos no mostrados). Juntos, estos resultados sugieren que ambos anticuerpos se unen fuera del sitio activo de HGFA y que son inhibidores alostéricos de actividad enzimática de HGFA.

Lista parcial de referencias

[0219]

1. Kirchhofer D, Peek M, Li W, Stamos J, Eigenbrot C, Kadkhodayan S, Elliott JM, Corpuz RT, Lazarus RA, Moran P. Tissue expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 36341 - 36349.
2. Dennis MS, Lazarus RA. Kunitz domain inhibitors of tissue factor-factor VIIa II. Potent and specific inhibitors by competitive phage selection. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 22137 - 22144.
3. Peek M, Moran P, Mendoza N, Wickramasinghe D, Kirchhofer D. Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 47804 - 47809.
4. Lee CV, Liang W-C, Dennis MS, Eigenbrot C, Sidhu SS, Fuh G. High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. *J. Mol. Biol.* 2004; 340.
5. Dickinson CD, Kelly CR, Ruf W. Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 14379 - 14384.
6. Dickinson CD, Shobe J, Ruf W. Influence of cofactor binding and active site occupancy on the conformation of the macromolecular substrate exosite of factor VIIa. *J. Mol. Biol.* 1998; 277: 959 - 971.
7. Dennis MS, Eigenbrot C, Skelton NJ, Ultsch MH, Santell L, Dwyer MA, O'Connell MP, Lazarus RA. Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature.* 2000; 404: 465 - 470.
8. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. y Vande Woude, G. F. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915 - 925.
9. Trusolino, L. y Comoglio, P. M. (2002) *Nature Rev. Cancer* 2, 289 - 300.
10. Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K. M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P. M. y Birchmeier, W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11574 - 11578.
11. Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B. y Godowski, P. J. (1992) *EMBO J* 11, 2503 - 2510.
12. Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T. y Kitamura, N. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20114 - 20119.
13. Gak, E., Taylor, W. G., Chan, A. M.-L. y Rubin, J. S. (1992) *FEBS Lett.* 311, 17 - 21.
14. Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. y Kitamura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10024 - 10028.
15. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A. y Moran, P. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 36341 - 36349.
16. Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K. y Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6370 - 6376.
17. Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M. y Dickson, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18237 - 18242.
18. Kawaguchi, T., Qin, L., Shimomura, T., Kondo, J., Matsumoto, K., Denda, K. y Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27558 - 27564.
19. Marlor, C. W., Delaria, K. A., Davis, G., Muller, D. K., Greve, J. M. y Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12202 - 12208.
20. Delaria, K. A., Muller, D. K., Marlor, C. W., Brown, J. E., Das, R. C., Rocznik, S. O. y Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12209 - 12214.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que se une al activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA) humano y bloquea la actividad proteolítica de HGFA, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de CDR de la cadena pesada que
5 comprende las secuencias de H1, H2 y H3 respectivas de un grupo seleccionado de SEQ ID NOS: 3 - 5, SEQ ID NOS: 6 - 8, SEQ ID NOS: 9 - 11, SEQ ID NOS: 21 - 23, SEQ ID NOS: 30 - 32, SEQ ID NOS: 36 - 38 o SEQ ID NOS: 39 - 41, y comprende una secuencia de CDR de la cadena ligera que comprende las secuencias de L1, L2 y L3 de SEQ ID NO: 54 o un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 45, y en el que el anticuerpo bloquea la proteólisis por HGFA de HGF monocatenario y bloquea la proteólisis por
10 HGFA del sustrato de molécula pequeña metanosulfonil-D-ciclohexilalanil-butil-arginina-paranitroanilida (FVIIa).
2. Anticuerpo de la reivindicación 1, que inhibe la señalización HGF/c-met.
3. Anticuerpo de la reivindicación 2, que inhibe la proliferación celular.
15
4. Anticuerpo de la reivindicación 2, que inhibe la angiogénesis.
5. Anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que las secuencias de H1, H2 y H3 son como se representan en SEQ ID NOS: 71, 85 y 99, SEQ ID NOS: 72, 86 y 100, SEQ ID NOS: 73, 87 y 101, SEQ ID NOS: 77,
20 91 y 105, SEQ ID NOS: 80, 94 y 108, SEQ ID NOS: 82, 96 y 110 o SEQ ID NOS: 83, 97 y 111.
6. Anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de CDR de la cadena pesada que comprende las secuencias de H1, H2 y H3 respectivas de un grupo seleccionado de SEQ ID NOS: 21 - 23 o SEQ ID NOS: 30 - 32.
25
7. Anticuerpo de la reivindicación 5, en el que las secuencias de H1, H2 y H3 son como se representan en SEQ ID NOS: 77, 91 y 105 o SEQ ID NOS: 80, 94 y 108.
8. Anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable
30 de la cadena ligera que tiene la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 54.
9. Anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad asociada a la desregulación de la señalización HGF/c-met en un sujeto, en el que la enfermedad es cáncer, tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmunitario y/o un trastorno relacionado con
35 angiogénesis.
10. Uso de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad asociada a desregulación de la señalización HGF/c-met en un sujeto, en el que la enfermedad es cáncer, tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario y/o un trastorno
40 relacionado con angiogénesis.
11. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 9 o uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad es cáncer.
- 45 12. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 9 o uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad es un trastorno relacionado con angiogénesis.
13. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 9 o uso según la reivindicación 10, en el que la enfermedad es un trastorno inmunitario.
50

Clon n°	Sib n° H1	H2										H3										Afinidad									
		30	31	32	33	49	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	95	96	97	98	99		100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	101	102
33	2	T	S	S	A	G	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	N	S	S	R	L	A	G	A							Y	12 nM
35	1	T	G	S	A	G	I	I	N	P	N	S	G	Y	T	D	S	A	R	I	R	G							Y	12 nM	
37	1	N	S	N	G	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	W	G	W	G									Y	56 nM	
39	1	N	G	T	Y	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	W	W	A	W	P	A							Y	6 nM	
42	1	N	G	T	W	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	W	R	A	V	P	S							Y	30 nM	
49	1	T	G	T	Y	G	W	I	S	P	Y	N	G	D	Y	Y	D	W	F	G	F	G	E						Y	2 nM	
58	1	T	G	S	A	A	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	Y	S	A	R	F	S								Y	1 nM	
61	1	S	G	N	W	A	E	I	N	P	Y	N	G	S	T	N	F	Y	R	W	S	V	N	S	V				Y	20 nM	
74	1	T	N	Y	W	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	S	I	P	A								Y	60 nM	
75	1	S	N	S	G	G	W	I	Y	P	T	G	G	A	T	D	F	W	W	R	S								Y	6 nM	
86	1	S	D	S	S	A	R	I	Y	P	T	S	G	N	T	N	G	L	K	V	P	F	Y	A	N	A	A		Y	19 nM	
90	1	S	G	S	A	A	I	I	N	P	T	G	G	Y	T	N	S	R	G	H	Y	A							Y	40 nM	
91	2	T	G	N	G	A	W	I	S	P	Y	G	G	S	T	N	G	H	R	V									Y	100 nM	
95	4	N	N	T	G	G	W	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	F	F	P	V	A								Y	4 nM	

FIG. 1A

Clon n°	H1	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	SEQ ID NO:
33	G	F	N	I	T	S	S	S	A	I	H	71
35	G	F	N	I	T	G	S	S	A	I	H	72
37	G	F	N	I	N	S	N	N	G	I	H	73
39	G	F	N	I	N	G	T	T	Y	I	H	74
42	G	F	N	I	N	G	T	T	W	I	H	75
49	G	F	N	I	T	G	T	T	Y	I	H	76
58	G	F	N	I	T	G	S	S	A	I	H	77
61	G	F	N	I	S	G	N	N	W	I	H	78
74	G	F	N	I	T	N	Y	Y	W	I	H	79
75	G	F	N	I	S	N	S	S	G	I	H	80
86	G	F	N	I	S	D	S	S	S	I	H	81
90	G	F	N	I	S	G	S	S	A	I	H	82
91	G	F	N	I	T	G	N	N	G	I	H	83
95	G	F	N	I	N	N	T	T	G	I	H	84

FIG. 1B

Clon n°	H2	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	SEQ ID NO:
33	G	I	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	85
35	G	I	I	I	N	P	N	S	G	Y	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	86
37	G	W	I	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	87
39	G	G	I	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	88
42	G	G	I	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	89
49	G	W	I	I	S	P	Y	N	G	D	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	90
58	A	I	I	I	N	P	N	G	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	91
61	A	E	I	I	N	P	Y	N	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	92
74	G	G	I	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	93
75	G	W	I	I	Y	P	T	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	94
86	A	R	I	I	Y	P	T	S	G	N	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	95
90	A	I	I	I	N	P	T	G	G	Y	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	96
91	A	W	I	I	S	P	Y	G	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	97
95	G	W	I	I	Y	P	A	G	G	A	T	D	Y	A	D	S	V	K	G	98

FIG. 1C

Clon nº	H3	93	94	95	96	97	98	99	100	a	b	c	d	e	f	101	102	SEQ ID NO:
33	A	R	S	S	S	R	L	A	G	A					M	D	Y	99
35	A	R	S	S	A	R	I	R	G						F	D	Y	100
37	A	R	W	G	G	W	G								F	D	Y	101
39	A	R	W	W	W	A	W	P	A						F	D	Y	102
42	A	R	W	W	R	A	V	P	S						F	D	Y	103
49	A	R	D	W	W	F	G	F	G	E					F	D	Y	104
58	A	R	S	S	A	R	F	S							F	D	Y	105
61	A	R	F	F	Y	R	W	S	V	N	S	V			M	D	Y	106
74	A	R	Y	Y	S	I	P	A							F	D	Y	107
75	A	R	F	F	W	W	R	S							F	D	Y	108
86	A	R	G	L	L	K	V	P	F	Y	A	N	A	A	M	D	Y	109
90	A	R	S	R	R	G	H	Y	A						M	D	Y	110
91	A	R	G	H	H	R	V								F	D	Y	111
95	A	R	F	F	F	P	V	A							F	D	Y	112

FIG. 1D

Secuencias de la región estructural de la cadena ligera

LC-FR1 ¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
²³ Thr Ile Thr Cys (SEQ ID NO: 55)

LC-FR2 ³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr (SEQ ID NO: 56)
⁴⁹

LC-FR3 ⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
⁸⁸ Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 57)

LC-FR4 ⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO: 58)
¹⁰⁷

Secuencias de la región estructural de la cadena pesada

HC-FR1 ¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
²⁵ Leu Ser Cys Ala Ala Ser (SEQ ID NO: 59)

HC-FR2 ³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val (SEQ ID NO: 60)
⁴⁸

HC-FR3 ⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn
⁸³ ^{83a} ^{83b} ^{83c} Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 61)
⁹²

HC-FR4 ¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 62)
¹¹³

FIG. 1E

Secuencias de la región estructural de la cadena ligera

LC-FR1 ¹ Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
²³ Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys (SEQ ID NO: 63)

LC-FR2 ³⁵ Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Tyr (SEQ ID NO: 64)
⁴⁹

LC-FR3 ⁵⁷ Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
⁸⁸ Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 65)

LC-FR4 ⁹⁸ Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys (SEQ ID NO: 66)
¹⁰⁷

Secuencias de la región estructural de la cadena pesada

HC-FR1 ¹ Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
²⁵ Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser (SEQ ID NO: 67)

HC-FR2 ³⁶ Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val (SEQ ID NO: 68)
⁴⁸

HC-FR3 ⁶⁶ Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
⁸³ ^{83a} ^{83b} ^{83c} Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys (SEQ ID NO: 69)
⁹²

HC-FR4 ¹⁰³ Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO: 70)
¹¹³

FIG. 1F

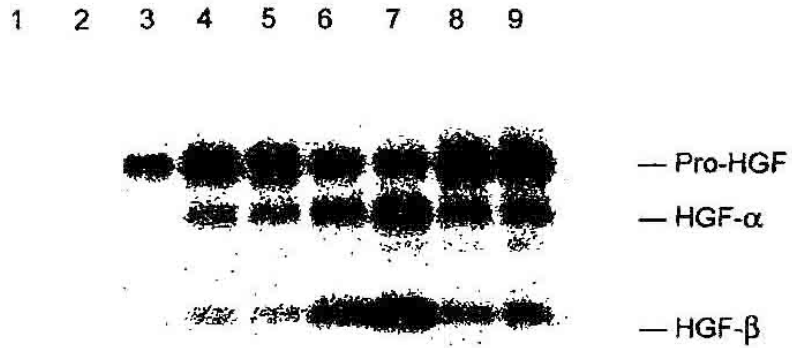


FIG. 2A

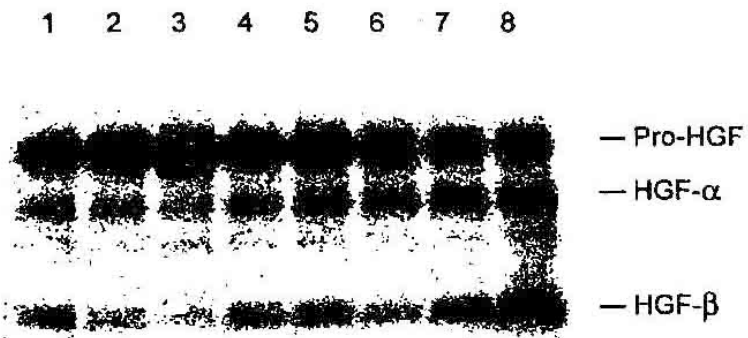


FIG. 2B

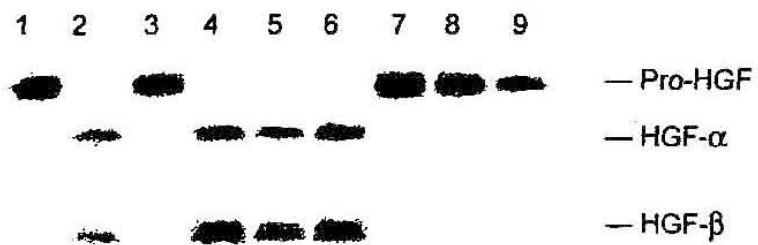


FIG. 3

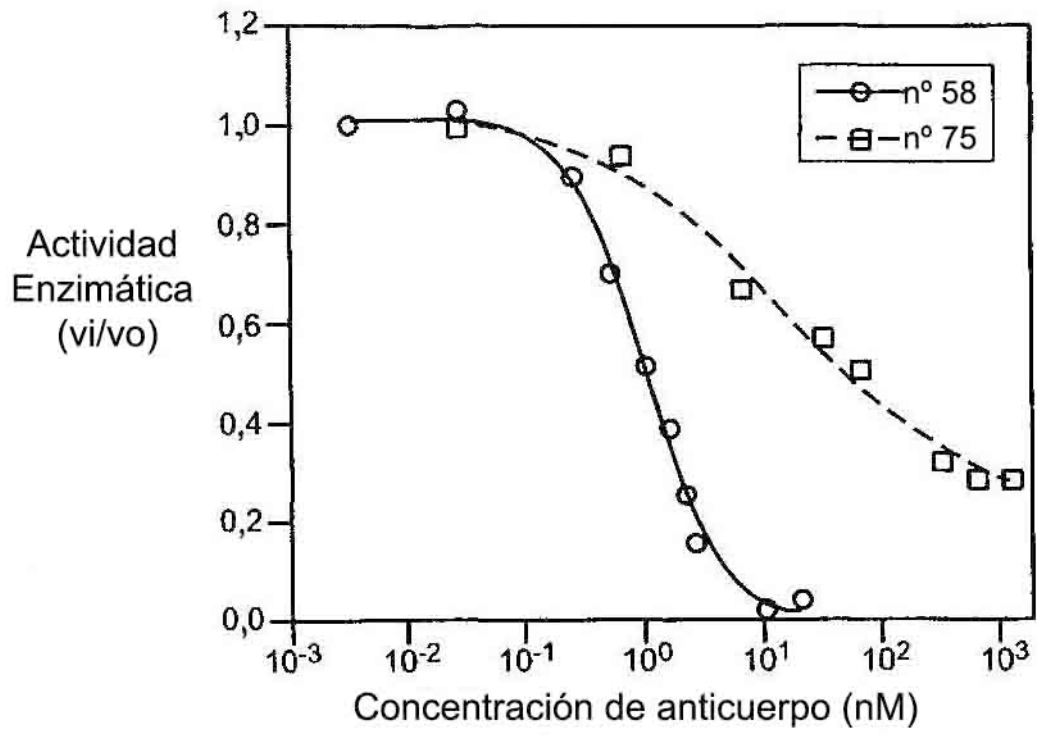


FIG. 4

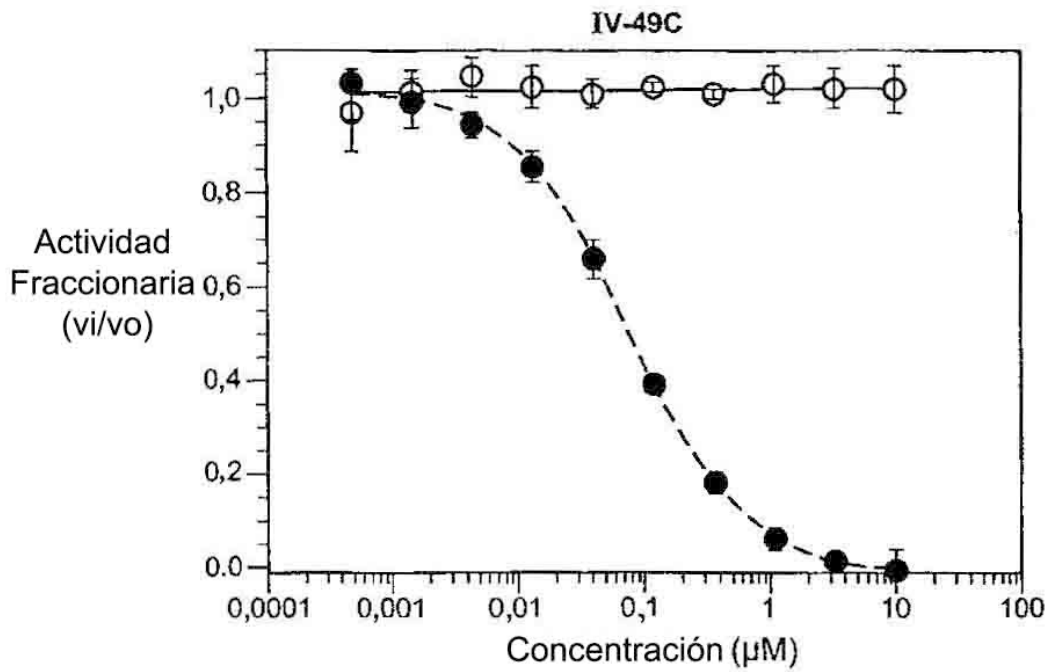


FIG. 5A

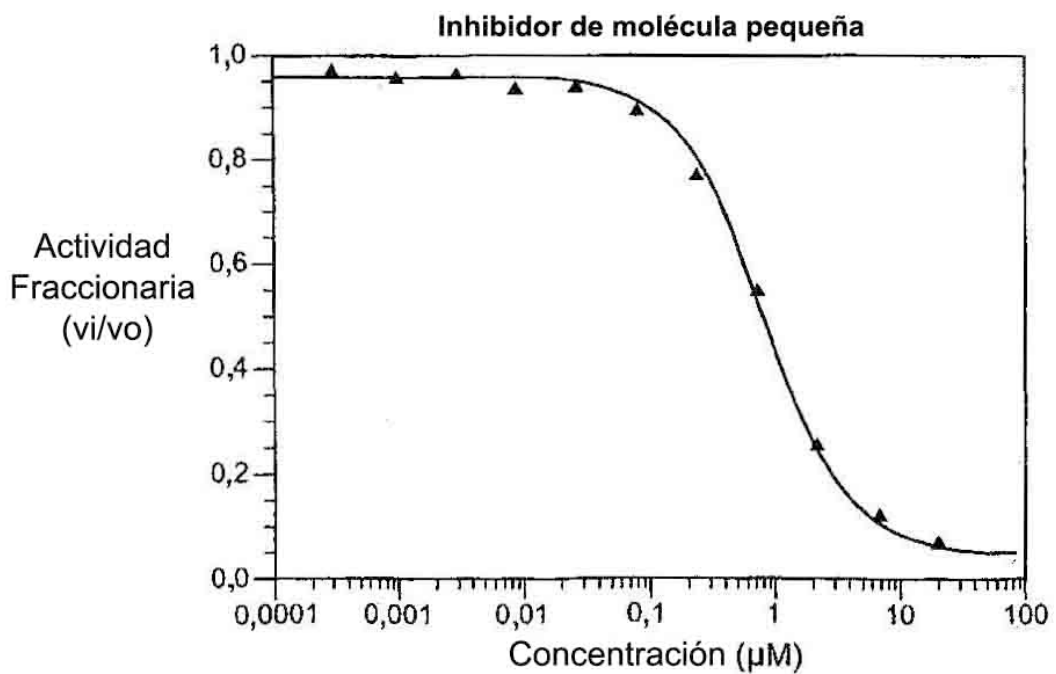


FIG. 5B

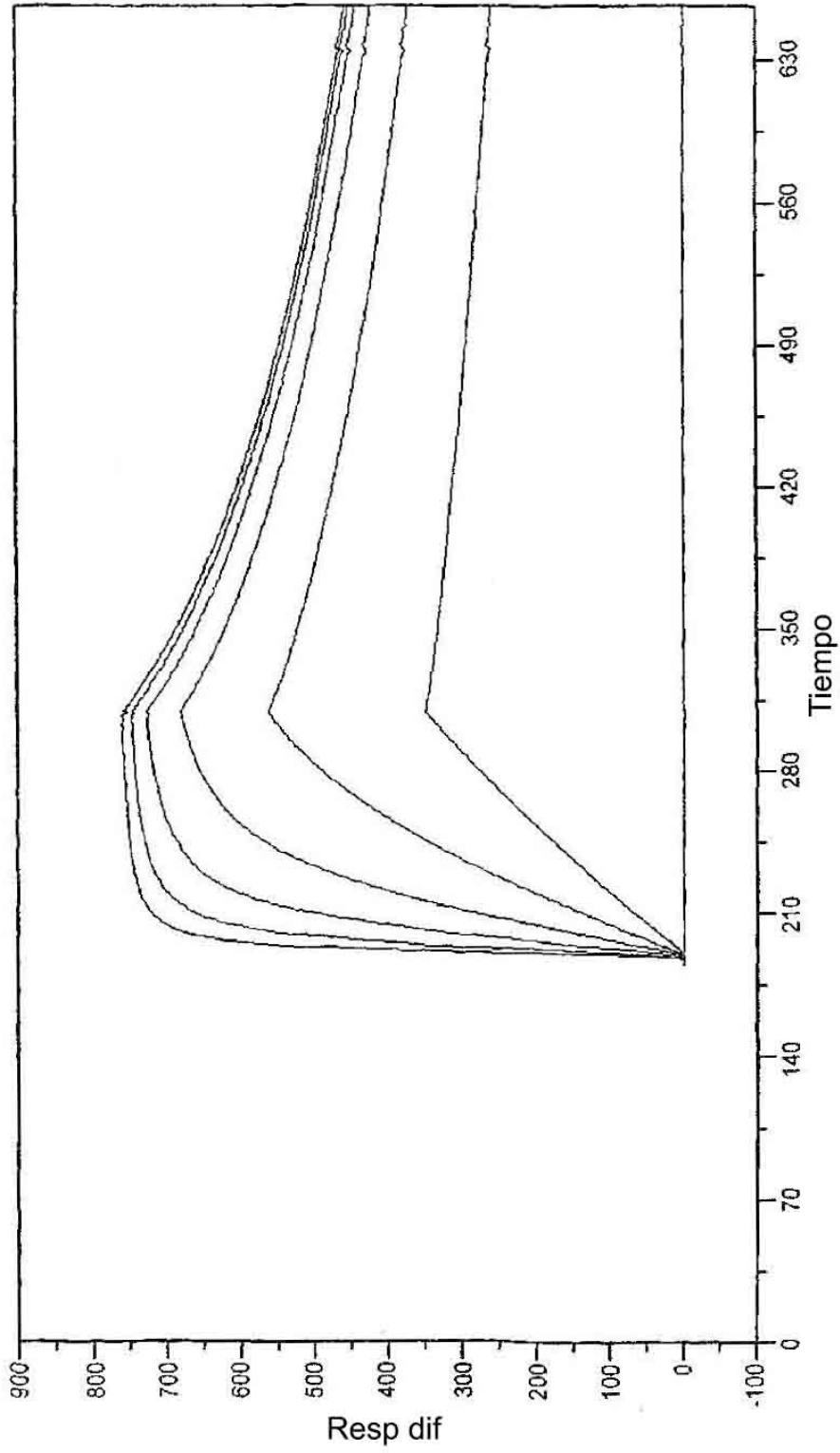


FIG. 6A

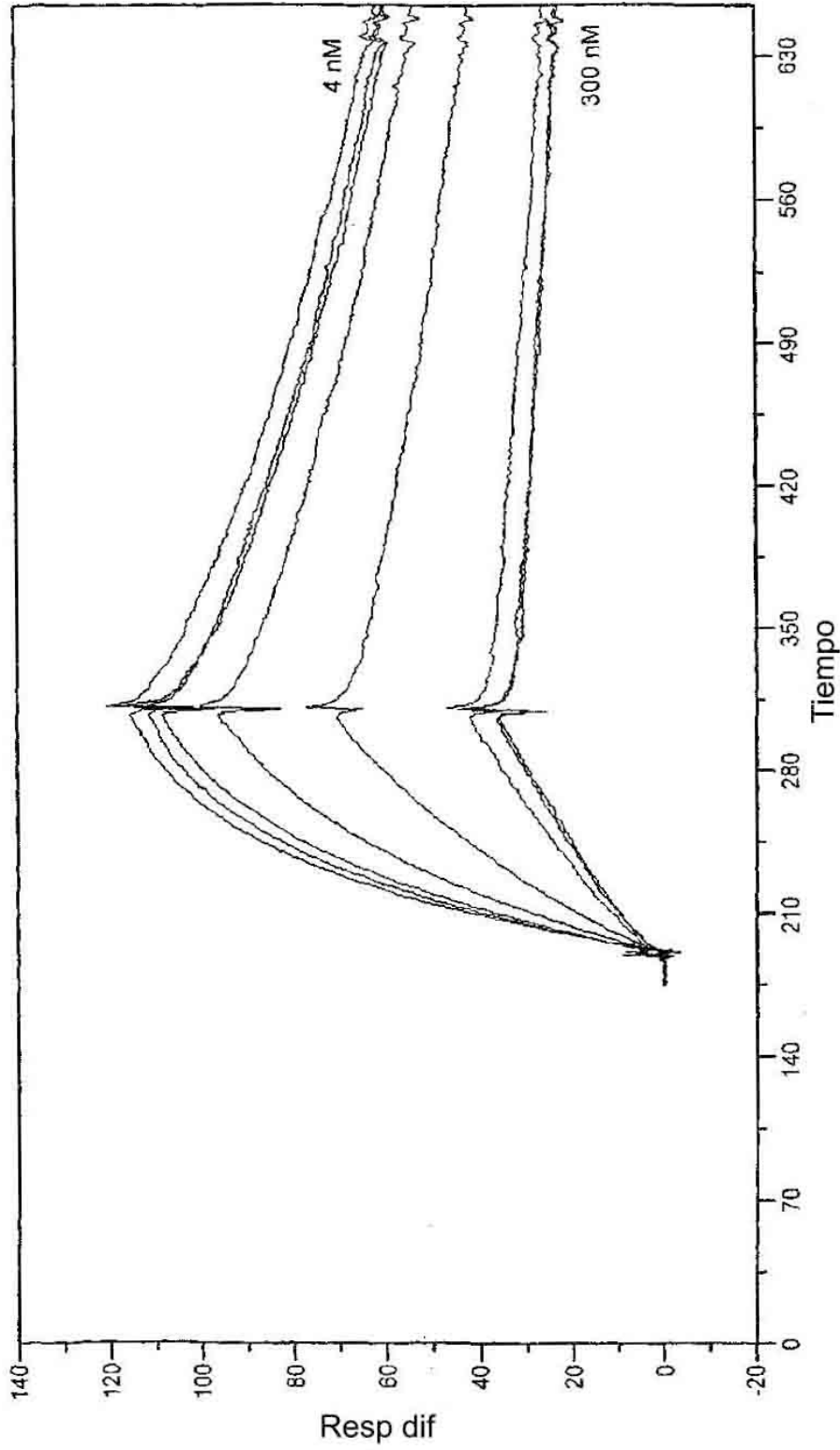


FIG. 6B

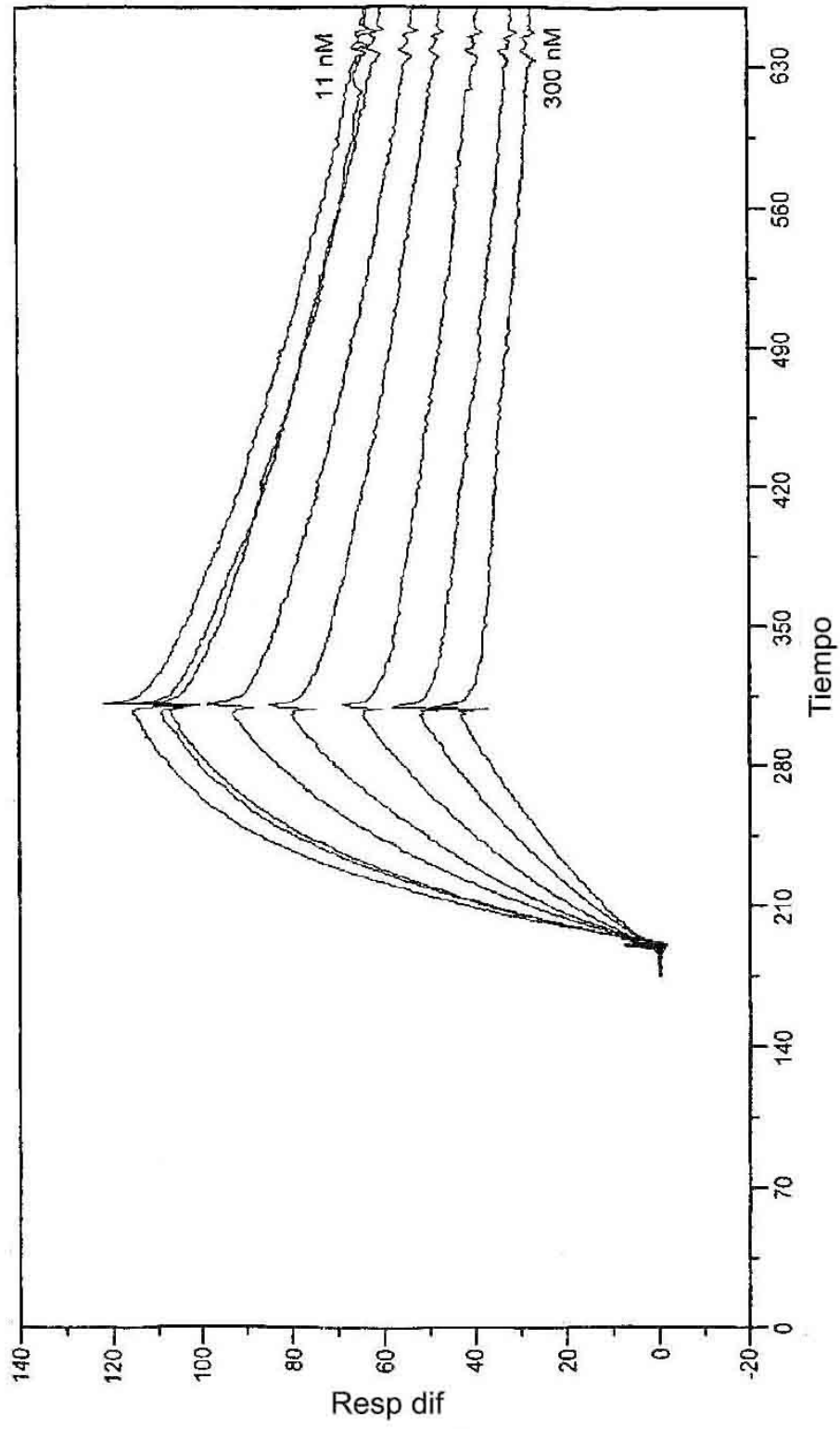


FIG. 6C

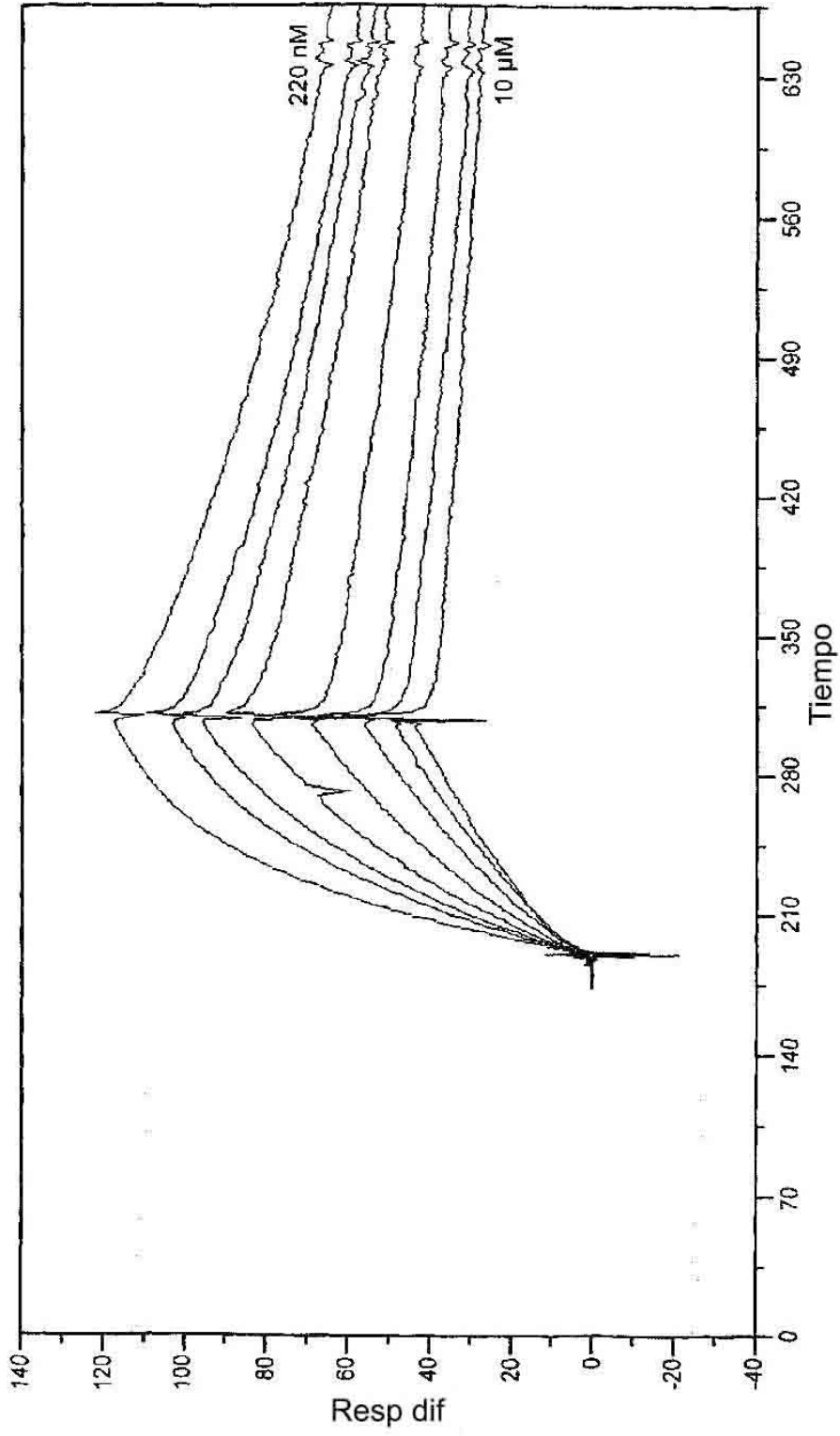


FIG. 6D

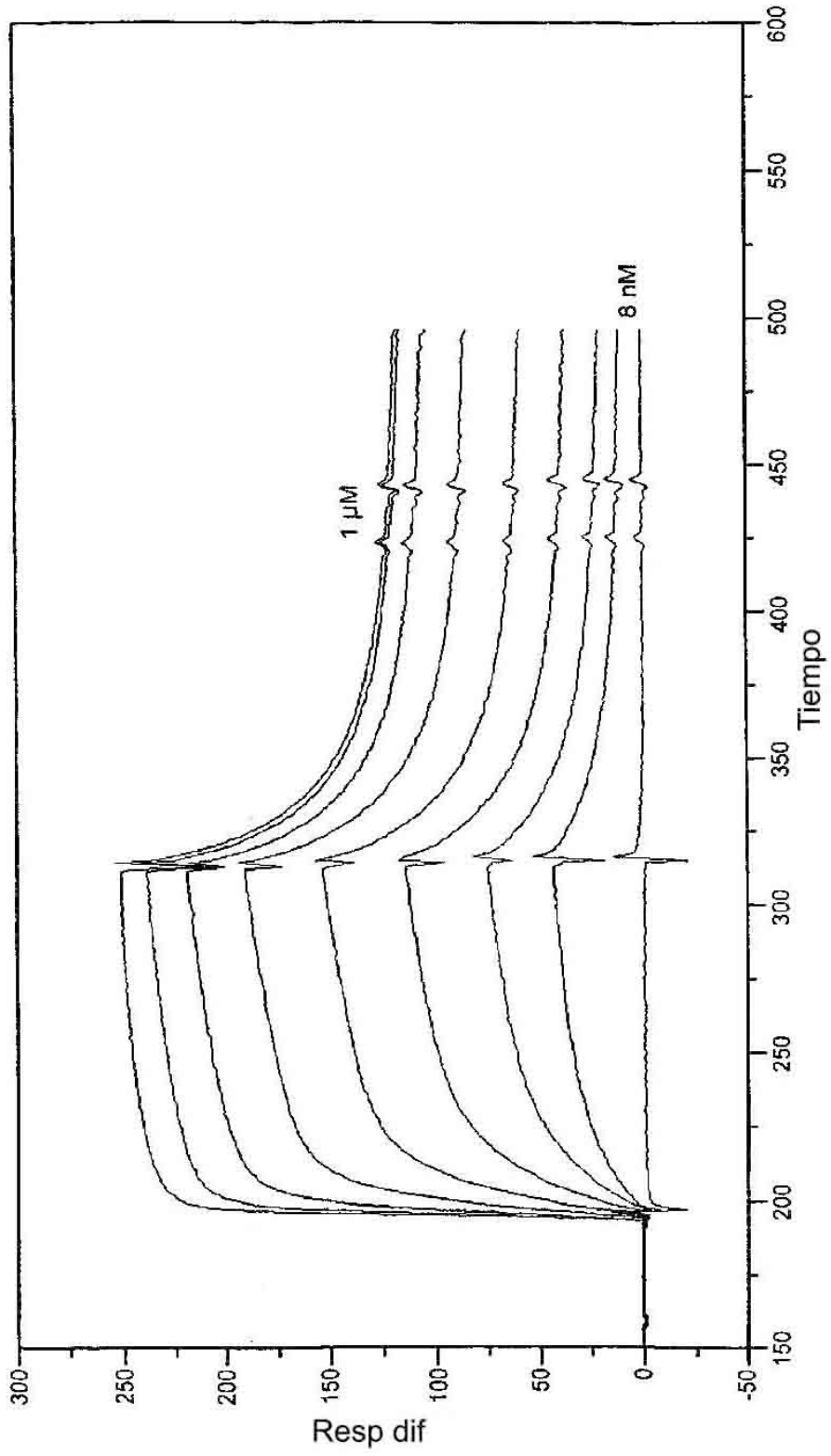


FIG. 6E

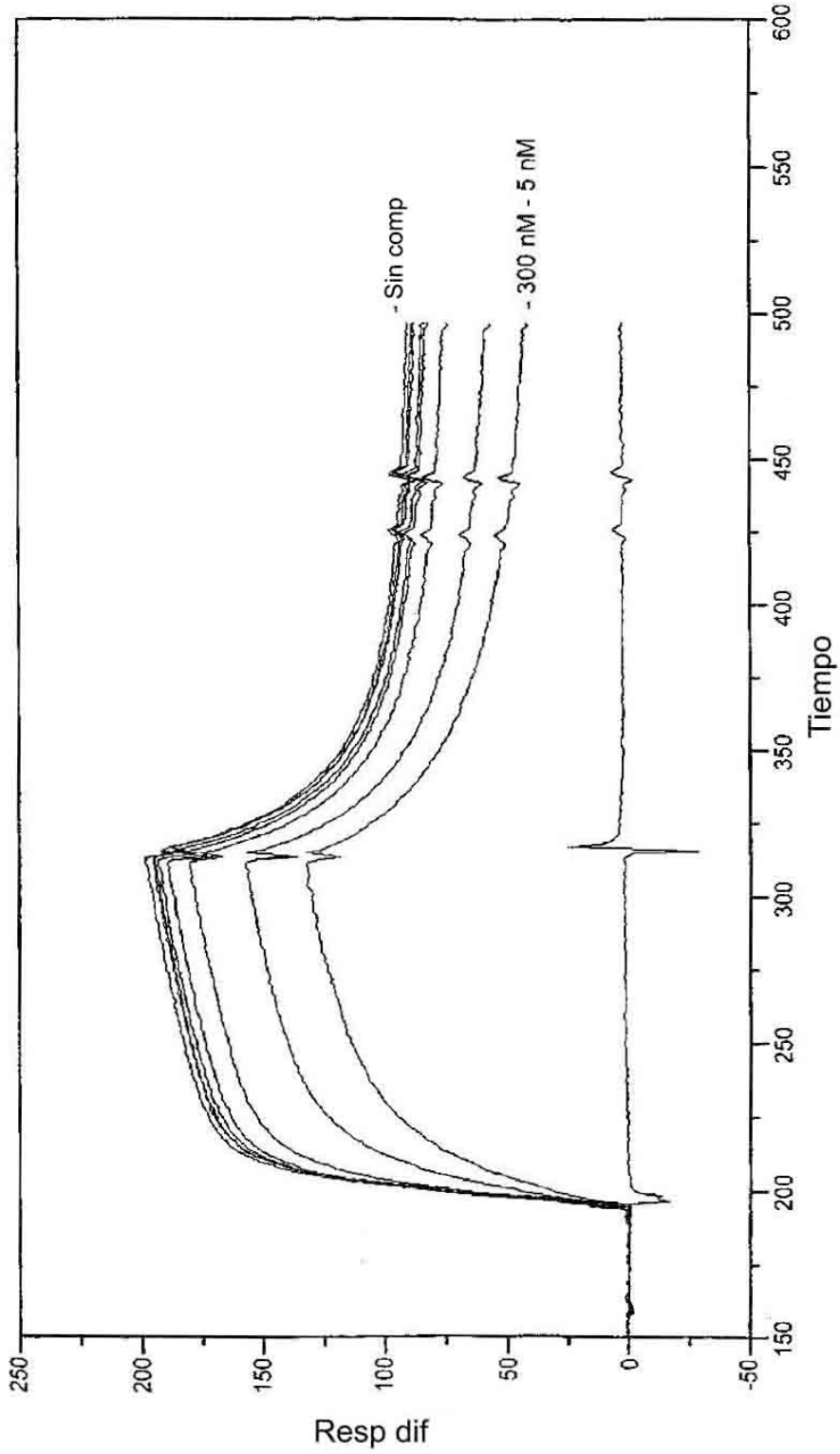


FIG. 6F

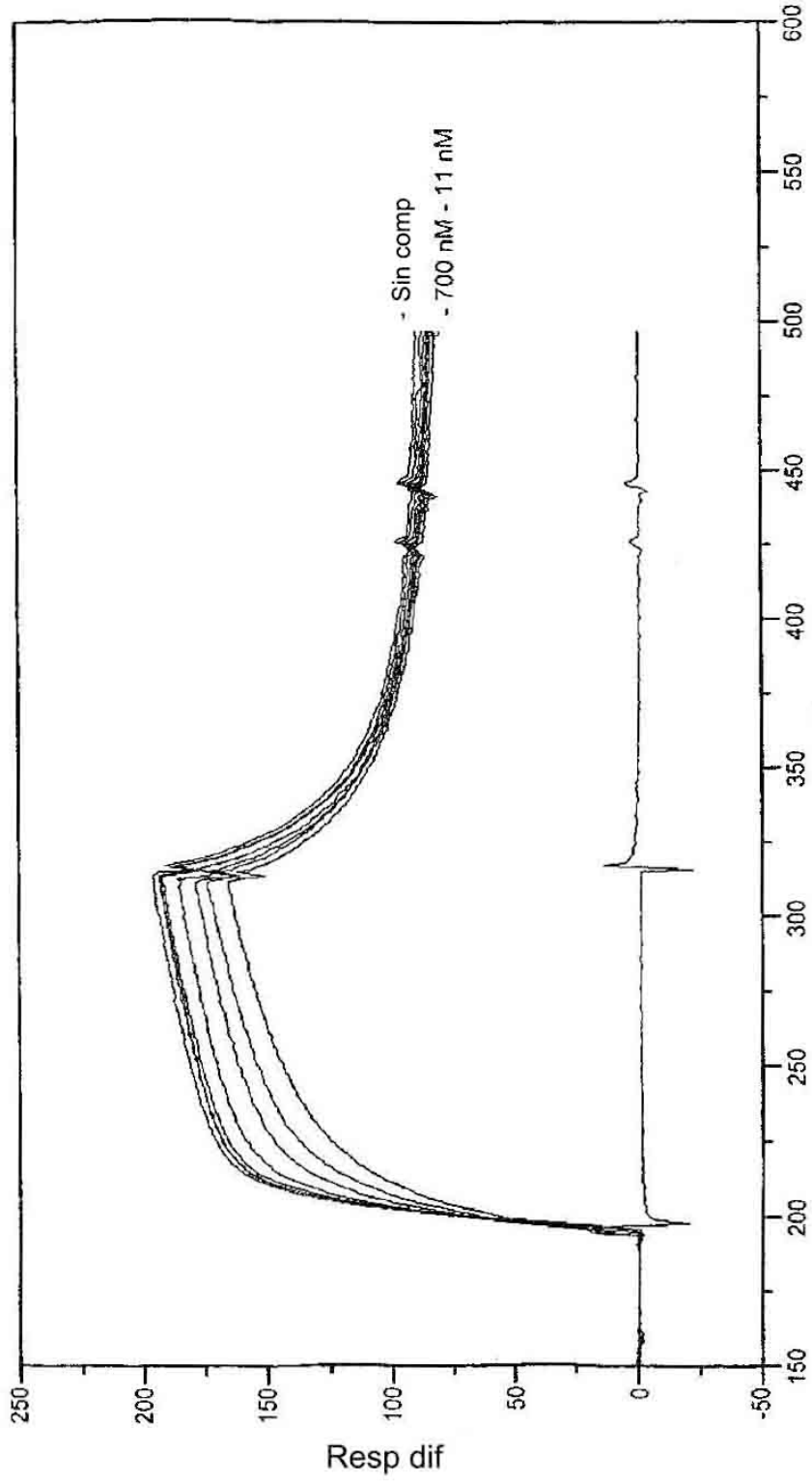


FIG. 6G

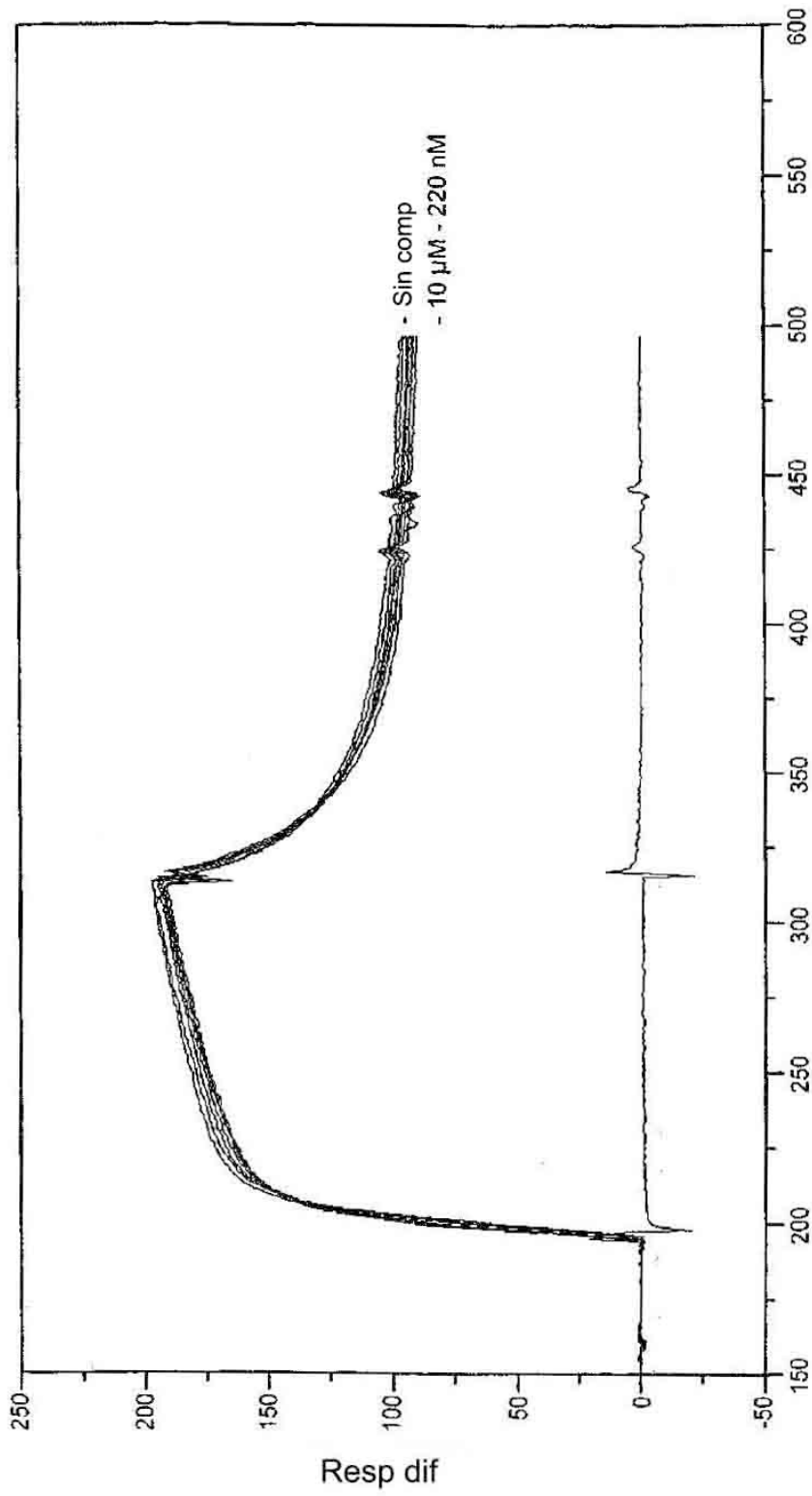


FIG. 6H

Inhibición de la Actividad Enzimática de HGFA por Anticuerpos Anti-HGFA

Anticuerpo nº	Ensayo de Sustrato Cromogénico ^a CI ₅₀ (nM)	proHGF de Sustrato Macromolecular Inhibición a Anticuerpo 670 nM ^b
33	15,3	**
35	21,3	**
37	334	**
39	>500	*
42	>500	**
49	>500	S.I.
58	1,3	***
61	>500	**
74	>500	**
75	32,6	**
86	>500	*
90	203	**
91	169	**
95	>500	*

^a El sustrato fue Spectrozyme® fVIIa a 0,2 nM (~KM)

^b Evaluación cualitativa de la inhibición basada en la desaparición de la banda de HGF monocatenario;

* Inhibición débil, ** inhibición fuerte, *** inhibición muy fuerte; S.I., sin inhibición

FIG. 8

Unión de HGFA a Anticuerpos Anti-HGFA

Unión de HGFA a Anticuerpos Anti-HGFA	Afinidad por ELISA en Fago CI ₅₀ (nM)	Afinidad por BIAcore K _D (nM)	Inhibición de HGFA Unión por IV49	Inhibición de HGFA Unión por Molécula Pequeña	Inhibición de HGFA Unión por sHAI-1B
58	2	1,3	++	++	++
75	6	100	+/-	-	+/-
37	56	ND ^a	+/-	+/-	ND ^a
74	60	ND ^a	+/-	-	+/-
42	30	ND ^a	+	+/-	+
61	20	ND ^a	+	-	+

++, +: > 50% de inhibición

+/-: 20-50% de inhibición

-: < 20% de inhibición

[HGFA]: 70 nM

[Competidor]: inicio a 10 veces por encima de KD informado, y disminución por dilución de 2 veces

^aND, no determinado

FIG. 9