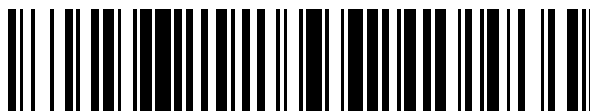


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 953**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2006 E 06749190 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1863519**

54 Título: **Modulación de la actividad de HGF/HGFR para tratar un linfedema**

30 Prioridad:

31.03.2005 US 667463 P

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

31.01.2014

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**DETMAR, MICHAEL y
KAJIYA, KENTARO**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 440 953 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

Modulación de la actividad de HGF/HGFR para tratar un linfedema

ANTECEDENTES

5 [0001] El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es un factor de crecimiento que puede encontrarse en el suero humano. El receptor de HGF (HGFR) ha sido identificado como el producto del protooncogén c-Met. Véase, p.ej., Bottaro *et al.*, *Science*, 251:802-804 (1991); Naldini *et al.*, *Oncogene*, 6:501-504 (1991); WO 92/13097 y WO 93/15754.

10 [0002] WO 02/29087 describe métodos para modular el crecimiento del vaso linfático en un mamífero mediante la administración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en concreto VEGF-2. En WO 02/29087 también se describe un método para tratar el linfedema utilizando VEGF-2.

RESUMEN

15 [0003] La invención proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) para su uso en el tratamiento del linfedema en un sujeto, donde se selecciona el agonista procedente del grupo que consiste en un polipéptido HGF o un fragmento biológicamente activo, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido HGF o un fragmento biológicamente activo del mismo. Se definen más características en las reivindicaciones dependientes.

20 [0004] También se describe en el presente documento un método para tratar a un sujeto que presenta una enfermedad de la piel no deseada, p.ej., una enfermedad que deteriora la estructura de la piel. El método incluye la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un modulador del HGF/HGFR. En un aspecto, la invención ilustra el uso de una cantidad efectiva de un modulador del HGF/HGFR (p.ej., un agonista o antagonista) en la preparación de un medicamento.

[0005] En un aspecto, el modulador es un agonista del HGF/HGFR. Un agonista del HGF/HGFR es un agente que aumenta directa o indirectamente la actividad del HGF/HGFR en el sujeto.

25 [0006] El agonista puede utilizarse para tratar una enfermedad o en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en el que se desea la formación aumentada de vasos linfáticos. Dichas enfermedades incluyen el linfedema, p.ej., linfedema adquirido. Entre los ejemplos de linfedema adquirido se incluyen el linfedema que se adquiere después de una intervención de cirugía o radioterapia o linfedema causado al menos en parte por una infección, p.ej., por un patógeno, p.ej., una infección como la filariasis. Otras afecciones en las que se desea una formación aumentada de los vasos linfáticos incluyen piel envejecida o piel deteriorada, p.ej., piel dañada por los rayos UVB. Incluso otras enfermedades engloban aquellas causadas en parte por un factor genético o ambiental, p.ej., radiación ultravioleta. Por ejemplo, la patología es epidermólisis, p.ej., epidermólisis causada por el envejecimiento o la exposición excesiva a la luz ultravioleta.

30

[0007] Muchos agonistas del HGF/HGFR aumentan la actividad de señalización del HGFR. Entre los ejemplos de agonistas del HGF/HGFR se engloba una proteína que incluye un polipéptido del factor de crecimiento de hepatocitos (p.ej., modificado en su forma heterodimérica madura) o un fragmento biológicamente activo o un análogo del mismo, un ácido nucleico que codifica un factor de crecimiento de hepatocitos o un fragmento biológicamente activo o análogo del mismo. También pueden utilizarse otras proteínas y moléculas, p.ej., anticuerpos y moléculas pequeñas, para aumentar la actividad del HGFR. Por ejemplo, los anticuerpos que unen, y opcionalmente entrecruzan (p.ej., dimerizan) HGFR para la actividad del HGFR.

35

40 [0008] Por ejemplo, la enfermedad no deseada es un trastorno cutáneo autoinmune o inflamatorio (p.ej., psoriasis), o dermatosis rosácea. Se puede utilizar una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de HGF/HGFR en la preparación de un medicamento para el tratamiento de dicho trastorno cutáneo autoinmune o inflamatorio, o dermatosis rosácea.

45 [0009] En un aspecto, el modulador es un antagonista del HGF/HGFR. Un antagonista del HGF/HGFR es un agente que disminuye directa o indirectamente la actividad del HGF/HGFR en una célula o en el sujeto. Los antagonistas incluyen ácidos nucleicos y proteínas, p.ej., anticuerpos o fragmentos del receptor de HGF soluble. Por ejemplo, el antagonista puede ser una proteína que interacciona con HGF y, p.ej., reduce la afinidad de unión del HGF a la superficie celular del HGFR. Por ejemplo, la proteína puede ser (i) un anticuerpo que reconoce el HGF o HGFR, o (ii) una proteína que incluye una región extracelular del HGFR, p.ej., un receptor de HGF soluble (p.ej., fusionado a un dominio Fc). Entre los ejemplos de antagonistas se incluyen: una molécula de ácido nucleico que puede unirse o, por el contrario, inhibir el ARNm de HGF, p.ej., la traducción, el procesamiento o la producción del ARNm. Otros antagonistas también engloban: una proteína HGF negativa dominante o un fragmento de la misma y un agente que

50

disminuye la expresión del ácido nucleico del HGF (p.ej., un factor de transcripción artificial o un ácido nucleico que codifica un factor de la transcripción artificial).

[0010] En algunas implementaciones, el modulador disminuye el nivel endógeno del HGF o del HGFR.

5 **[0011]** En un aspecto, la divulgación presenta un método para tratar un sujeto que padece o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica, p.ej., un cáncer metastásico, en concreto el que incluye metástasis celular en los vasos linfáticos o un cáncer que tiene la posibilidad de producir metástasis a los ganglios linfáticos. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista del HGF/HGFR que disminuye la actividad del HGF/HGFR en el sujeto. Puede utilizarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del HGF/HGFR en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece o
10 está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica, p.ej., un cáncer metastásico.

[0012] Los antagonistas comprenden ácidos nucleicos y proteínas, p.ej., anticuerpos o fragmentos del receptor de HGF soluble. Por ejemplo, el antagonista puede ser una proteína u otro agente que interacciona con un HGF y, p.ej., reduce la afinidad de unión del HGF al HGFR de superficie celular. Por ejemplo, la proteína puede ser un anticuerpo de HGF o una región extracelular del HGFR, p.ej., un receptor de HGF soluble. Entre los ejemplos de antagonistas
15 se incluyen: una molécula de ácido nucleico que puede unirse o, por el contrario inhibir, el ARNm de HGF, p.ej., la traducción, el procesamiento o la producción del ARNm. Otros antagonistas engloban: una proteína HGF negativa dominante o un fragmento de la misma y un agente que disminuye la expresión del ácido nucleico del HGF (p.ej., un factor de la transcripción artificial o un ácido nucleico que codifica un factor de la transcripción artificial).

[0013] En otro aspecto, la divulgación presenta un método para tratar a un sujeto que padece o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica, p.ej., un cáncer metastásico, en concreto el que incluye metástasis celular en los vasos linfáticos o un cáncer que tiene la posibilidad de producir metástasis en los ganglios linfáticos. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de integrina $\alpha 9$ que disminuye la actividad de integrina $\alpha 9$ en el sujeto. Por ejemplo, el antagonista es una proteína u otro agente que interacciona con integrina $\alpha 9$ o una subunidad beta de integrina equivalente y, p.ej., reduce la afinidad de unión de integrina a las
20 células. Por ejemplo, la proteína puede ser un anticuerpo para integrina $\alpha 9$ o una subunidad beta de integrina equivalente o una región extracelular de un receptor de integrina $\alpha 9$. Puede utilizarse una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de integrina $\alpha 9$ en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad neoplásica, p.ej., un cáncer metastásico.

[0014] Los ejemplos de antagonistas incluyen: una molécula de ácido nucleico que puede unirse a, o por el contrario inhibir, ARNm de integrina $\alpha 9$, p.ej., la traducción, el procesamiento o la producción de ARNm. Otros antagonistas incluso engloban: una proteína de integrina $\alpha 9$ negativa dominante o un fragmento de la misma y un agente que disminuye la expresión del ácido nucleico de integrina $\alpha 9$ (p.ej., un factor de transcripción artificial o un ácido nucleico que codifica un factor de transcripción artificial).

[0015] En otro aspecto más, la divulgación presenta un método para evaluar una célula o un sujeto (p.ej., usando células procedentes del sujeto). El método incluye la evaluación del ARNm de integrina $\alpha 9$ y estaniocalcina 1 o expresión de proteína en una célula o en células procedentes del sujeto. El método puede utilizarse para evaluar la actividad del HGF en el sujeto. Por ejemplo, la célula o células obtenidas del sujeto incluyen células endoteliales, p.ej., células endoteliales linfáticas (LEC). La célula o el sujeto puede tratarse, p.ej., antes durante o después de la evaluación, con un agente descrito en el presente documento, p.ej., un agonista o antagonista de HGF/HGFR. El método puede utilizarse para controlar un sujeto que padece o está en riesgo de padecer una enfermedad descrita en el presente documento y que puede ser tratado con un agente descrito en el presente informe.

[0016] En otro aspecto, la divulgación presenta un método para identificar un compuesto que modula la actividad de las células endoteliales linfáticas, p.ej., proliferación o migración. El método incluye: producir una célula u organismo en los que pueda monitorizarse la actividad de HGF/HGFR; contactar la célula o el organismo con un compuesto de prueba; y evaluar la actividad del HGF/HGFR en la célula u organismo. Por ejemplo, la célula incluye un reportero de la actividad del HGF/HGFR o un organismo que comprende dicha célula. Puede evaluarse la actividad del HGF/HGFR probando, p.ej., la actividad del reportero o expresión del ARNm o proteína. Un cambio en la actividad del reportero u otro parámetro relevante indica, por ejemplo, un cambio en la actividad del HGF/HGFR. El método también puede incluir la evaluación del efecto del compuesto de prueba en la proliferación celular o en la migración de células, p.ej., proliferación o migración de células endoteliales linfáticas.

[0017] En un aspecto, el reportero es un gen que comprende una secuencia que codifica una proteína detectable y un promotor unido de modo funcional que incluye una región del promotor del gen del HGF o HGF-R. p.ej., región del sitio de inicio de la transcripción a una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5', del codón MET iniciador a una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5' o de la caja TATA a una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5'.

[0018] La célula o organismo es en general de mamífero, p.ej., humano o no humano, p.ej., de ratón, rata, hámster, conejillo de Indias, mono y demás.

5 **[0019]** En otro aspecto, la divulgación presenta un método para identificar un compuesto que modula la actividad de células endoteliales, por ejemplo, un compuesto que inhibe la migración o proliferación de células endoteliales linfáticas dependientes del factor de crecimiento de hepatocitos. El método incluye: proporcionar una célula endotelial (p.ej., una célula endotelial linfática) que expresa un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; contactar la célula endotelial con el factor de crecimiento de hepatocitos y un compuesto de prueba; y evaluar la célula, p.ej., para determinar una propiedad, p.ej., una propiedad regulada por HGF/HGFR, como la proliferación o migración. Por ejemplo, el método puede incluir determinar si la proliferación o migración de las células endoteliales linfáticas se altera en presencia del compuesto de prueba. Una disminución en la proliferación o migración puede indicar que el compuesto de prueba inhibe la proliferación de células endoteliales linfáticas dependientes del factor de crecimiento de hepatocitos.

15 **[0020]** La célula endotelial puede ser una célula de mamífero, p.ej., una célula de ratón, rata, conejo, hámster o humano. La célula puede cultivarse o aislarse; por ejemplo, la célula procede de una línea celular o es una célula primaria. En un aspecto, la célula expresa Prox1 y el receptor de hialuronano LYVE-1.

[0021] El método puede incluir la evaluación del compuesto de prueba en presencia de otro modulador de la vía del HGF/HGFR, p.ej., en presencia de una proteína que incluye HGF soluble, una proteína que incluye un dominio extracelular soluble de HGFR, o anticuerpo a HGF o HGFR,

20 **[0022]** El método puede incluir la evaluación de la fosforilación de tirosina del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, p.ej., para determinar si el compuesto de prueba causa una disminución. En un aspecto, la célula endotelial linfática expresa un receptor del factor de crecimiento de hepatocitos recombinante o un mutante del mismo.

25 **[0023]** El método puede incluir además la administración del compuesto de prueba a un organismo, p.ej., un mamífero humano o no humano. El método también puede incluir la formulación de un compuesto de prueba o un compuesto de prueba modificado que retiene la actividad biológica del compuesto de prueba como una composición farmacéutica, p.ej., mediante la combinación del compuesto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 **[0024]** En otro aspecto más, la divulgación presenta un método para evaluar un compuesto de prueba, p.ej., un compuesto que se aplica de modo tópico a un organismo de prueba, p.ej., un organismo transgénico que incluye un reportero de la actividad de la vía de HGF/HGFR. El método incluye contactar un compuesto de prueba con el organismo de prueba y evaluar la actividad de la vía de HGF/HGFR. Por ejemplo, la evaluación puede incluir evaluar la proteína o expresión del ARNm de HGF. HGFR o un gen o producto génico que se regula por HGFR, p.ej., integrina $\alpha 9$ o estaniocalcina 1. El método también puede englobar la evaluación del compuesto de prueba en presencia de otro modulador de la vía del HGF/HGFR, p.ej., en presencia de una proteína que incluye HGF soluble, una proteína que incluye un dominio extracelular soluble de HGFR, o anticuerpo a HGF o HGFR.

35 **[0025]** En un aspecto, el reportero es un gen que incluye una secuencia que codifica una proteína detectable y un promotor unido de modo funcional que incluye una región del promotor del gen de integrina $\alpha 9$, estaniocalcina 1, HGF o HGFR, p.ej., región del sitio de inicio de la transcripción a una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5', del codón MET iniciador a una posición al menos 100, 200, 300, 500, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5' o de la caja TATA a una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5'. El método también puede incluir la evaluación de dos o más de estos reporteros.

45 **[0026]** El método puede incluir la selección de un compuesto de prueba (p.ej., de una colección de compuestos de prueba), si el compuesto aumenta o disminuye la actividad de la vía de HGF/HGFR. Puede formularse un compuesto de prueba seleccionado, p.ej., una composición farmacéutica, p.ej., adecuada para la administración tópica u otra vía de administración. El método también incluye la administración de una composición farmacéutica a un sujeto, p.ej., a un sujeto que padece o está en riesgo de padecer un desorden de los descritos en el presente documento.

[0027] Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se describen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Las otras características, objetos y ventajas de la invención serán claros gracias a la descripción, dibujos y reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 **[0028]**

La FIG 1 muestra los datos de la RT-PCR cuantitativa para los niveles del ARNm del marcador de linaje de células linfáticas y RT-PCR cuantitativa y ensayos de inmunotransferencia para proteína y ARNm de HGFR, respectivamente.

La FIG 2 muestra la tinción por inmunofluorescencia doble para el marcador linfático LYVE-1 (verde) y para HGFR (rojo), en los vasos linfáticos.

La FIG 3 muestra la inmunofluorescencia doble para el marcador linfático LYVE-1 (verde) y HGFR (rojo) en células endoteliales de bolsas linfáticas durante el desarrollo embrionario de ratón.

5 La FIG 4 muestra los datos para un ensayo de migración y proliferación de las células endoteliales linfáticas (LEC) para células LEC tratadas con HGF.

La FIG 5 muestra datos para la formación del tubo de LEC *in vitro*, en respuesta a la formación de vasos linfáticos y HGF *in vivo*.

10 La FIG 6 muestra la tinción por inmunofluorescencia doble *in vitro* de los vasos linfáticos para LYVE-1 (verde) y CD31 (rojo) después de inflamación cutánea experimental.

La FIG 7 muestra los datos de la QPCR para los niveles del ARNm de integrina $\alpha 9$ y estaniocalcina 1 en las LEC después del tratamiento con HGF.

15 La FIG 8 muestra las imágenes histológicas representativas (tinción H&E e inmunofluorescencia para detectar podoplanina) del íleo en ratones transgénicos por el HGF (Figuras 8 B, D, F, H) y de tipo salvaje (Figuras 8 A, C, E, G). Barras de escala: 100 μ m.

20 La FIG 9 muestra el análisis de inmunofluorescencia doble de las secciones de la oreja de un ratón para LYVE-1 (verde) y CD31 (rojo). La inducción de la formación de vaso linfático de LYVE-1 positivo se observó 14 días después de la implantación de sedimentos de liberación lenta que contienen HGF (9B y C; puntas de flechas), pero no de sedimentos de control (9A). El tratamiento sistémico con un anticuerpo anti-VEGFR-3 bloqueante (9C) no inhibió la formación de vasos linfáticos inducidos por HGF, en comparación con el tratamiento de IgG de control (9B). Se observaron vasos sanguíneos formados nuevos en todos los ejemplos. P: sedimento. Barras de escala: 100 μ m.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 **[0029]** Hemos descubierto que, entre otras cosas, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR) está altamente expresado en células endoteliales linfáticas (LEC) del sistema linfático. El tratamiento de las LEC con HGF facilita la proliferación, migración y organización de las LEC en los vasos. Además, la administración del HGF a ratones facilitó de manera potente la formación de nuevos vasos linfáticos. Además, la inducción de la migración de LEC fue mediada en gran medida a través de integrina $\alpha 9$.

30 **[0030]** En consecuencia, es posible tratar patologías del sistema linfático mediante la modulación de la actividad del HGF/HGFR. También se puede diagnosticar con la evaluación de un parámetro que evalúe la actividad del HGF/HGFR. Los agentes que modulan la actividad del HGF/HGFR pueden identificarse, p.ej. empleando los métodos de cribado y ensayo descritos en el presente documento.

I. HGF Y HGFR

35 **[0031]** La forma madura del HGF humano (hHGF), correspondiente a la forma mayor purificada procedente de suero humano, es un heterodímero de enlace disulfuro derivado por escisión proteolítica de la prohormona humana entre los aminoácidos R494 y V495. Este proceso de escisión genera una molécula compuesta de una subunidad α de 440 aminoácidos (Peso molecular: 69 kDa) y una subunidad β de 234 aminoácidos (Peso molecular: 34 kDa). Las cadenas α y β son producidas a partir de un marco abierto de lectura único que codifica para una proteína precursora pre-pro. En la estructura primaria predicha de un hGFH maduro ejemplar, se forma un enlace S-S intercadena entre Cys 487 de la cadena α y Cys 604 en la cadena β (véase, p.ej., Nakamura *et al.*, *Nature* 342:440-443, (1989)). El extremo N-terminal de la cadena α está precedido por 54 aminoácidos, empezando con un grupo de metionina. Este segmento incluye una secuencia líder (señal) hidrofóbica característica de 31 residuos y la prosequencia. La cadena α empieza en el aminoácido (aa) 55 y contiene cuatro dominios Kringle. El dominio Kringle 1 se extiende de aproximadamente el aa 128 a aproximadamente el aa 206, el dominio Kringle 2 está entre aproximadamente el aa 211 y aproximadamente el aa 288, el dominio Kringle 3 se extiende de aproximadamente el aa 303 a aproximadamente el aa 383 y el dominio Kringle 4 se extiende de aproximadamente el aa 391 a aproximadamente el aa 464 de la cadena α . Un HGF ilustrativo contiene cuatro sitios de glicosilación supuestos, que están situados en las posiciones 294 y 402 de la cadena α y en las posiciones 566 y 653 de la cadena β .

50 **[0032]** El receptor de HGF (HGFR) ha sido identificado como el producto del protooncogén c-Met, Bottaro *et al.*, *Science*, 251:802-804 (1991); Naldini *et al.*, *Oncogene*, 6:501-504 (1991); WO 92/13097 publicada el 6 de agosto de 1992; WO 93/15754 publicada el 19 de agosto de 1993. El receptor (ensayo de quina de autoactivación (AKA) c-Met) normalmente comprende, en su forma nativa, una proteína de tirosina cinasa internas heterodimérica (una

cadena α de 50 kDa de enlace disulfuro y una cadena β de 145 kDa) de 190 kDa Park *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 84:6379-6383 (1987)).

5 **[0033]** Se cree que la actividad de unión del HGF a su receptor se transmite por un dominio funcional situado en la porción del extremo N-terminal de la molécula HGF, incluyendo los dos primeros dominios Kringle. (Matsumoto *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181:691-699 (1991); Hartmann *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:11574-11578 (1992); Lokker *et al.*, *EMBO J.*, 11:2503-2510 (1992); Lokker y Godowski, *J. Biol. Chem.*, 268:17145-17150 (1991)). Después de la unión del HGF, la proteína c-Met se fosforila en residuos de tirosina de la subunidad β de 145 kDa.

10 **[0034]** En relación con los métodos presentados en el presente documento, el HGF puede producirse como un polipéptido purificado, para el que la secuencia de aminoácidos puede ser al menos 80% idéntica (es decir, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% o 100% idéntica) a cualquier secuencia de las SEQ ID N°:1-4 enumeradas a continuación o cualquier otra variante de origen natural del HGF. El receptor para HGF (HGFR) se puede producir como un polipéptido purificado, para el que la secuencia de aminoácidos puede ser al menos 80% idéntica (es decir, 85%, 87%, 89%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% o 100% idéntica) a cualquiera secuencia de las SEQ ID N°:5-8 enumeradas a continuación o cualquier otra variante de origen natural del HGFR

15 LISTA DE SECUENCIAS

HGF humano (SEQ ID N°:1)

[0035]

```

1 MWVTKLLPAL LLQHVLLHLL LLPIAIPYAE GQRKRRNTIH EFKKSATTL
51 IKIDPALKIK TTKVNTADQC ANRCTRNKGL PFTCKAFVFD KARKQCLWFP
101 FNSMSSGVKK EFGHEFDLYE NKDYIRNCII GKGRSYKGTV SITKSGIKCQ
151 PWSSMIPHEH SFLPSSYRGK DLQENYCRNP RGEEGGPWCF TSNPEVRYEV
201 CDIPQCSEVE CMTCN GESYR GLMDHTESGK ICQRWDHQTTP HRHKFLPERY
251 PDKGFDDNYC RNPDGQPRPW CYTLDPHTRW EYCAIKTCAD NTMNDTDVPL
301 ETTECIQQGQ EGYRGTVNTI WNGIPCQRWD SQYPHEHDMT PENFKCKDLR
351 ENYCRNPDGS ESPWCFTTDP NIRVGYCSQI PNCDSHMGQD CYRGNKNYM
401 GNLSQTRSGL TCSMW DKNME DLHRHIFWEP DASKLNENYC RNPDDDAHGP
451 WCYTGNPLIP WDYCPISRCE GDTTPTIVNL DHPVISCAKT KQLRVVNGIP
501 TRTNIGWMVS LRYRNKHICG GSLIKESWVL TARQCFPSRD LKDYEAWLGI
551 HDVHGRGDEK CKQVLNVSQ L VYGPEGSDLV LMKLARPAVL DDFVSTIDL P
601 NYGCTIPEKT SCSVYGWGYT GLINYDGLLR VAHLYIMGNE KCSQHHRGKV
651 TLNESEICAG AEKIGSGPCE GDYGGPLVCE QHKMRMVLGV IVPGRGCAIP
701 NRP GIFVRVA YYAKWIHKII LTYKVPQS
    
```

HGF de chimpancé (SEQ ID N°:2)

20 **[0036]**

```

1 MWVTKLLPAL LLQHVLLHLL LLPIAIPYAE GQRKRRNTIH EFKKSATTL
51 IKIDPALKIK TTKVNTADQC ANRCTRNKGL PFTCKAFVFD KARKQCLWFP
101 FNSMSSGVKK EFGHEFDLYE NKGHETFGRF LPSSYRGKDL QENYCRNPRG
151 EEGGPWCFTS NPEVRYEVCD IPQCSEVECM TCNGESYRGL MDHTESGKIC
201 QRWDHQTTPHR HKFLPERYPD KGFDDNYCRN PDGQPRPWCY TLDPHTRWEY
251 CAIKTCADNT MNDDTDVPLET TECIQGQEGE YRGTVNTIWN GIPCQRWDSQ
301 YPHEHDMTPE NFKCKDLREN YCRNPDGSES PWCFTTDPNI RVGYCSQIPN
351 CDSHMGQDCY RGNGKNYMGN LSQTRSGLTC SMW DKNMEDL HRHIFWEPDA
401 SKLNENYCRN PDDDAHGPWC YTG NPLIPWD YCPISRCEGD TTPTIVNLDH
451 PVISCAKTKQ LRVVNGIPTR TNVGMVSLR YRNKHICGGS LIKESWV LTA
501 RQCFPSRDLK DYEAWLGIHD VHGRGDEKCK QVLNVSQLVY GPEGSDLVLM
551 KLARPAVLDD FVSTIDL PNY GCTIPEKTSC SVYGWGYTGL INYDGLLRVA
601 HLYIMGNEKC SQHHRGKVTL NESEICAGAE KIGSGPCEGD YGGPLVCEQH
651 KMRMVLGVIV PGRGCAIPNR PGIFVRVAYY AKWIHKIILT YKVPQS
    
```

HGF de ratón (SEQ ID Nº:3)

[0037]

1 MMWGTKLLPV LLLQHVLHL LLLHVAIPYA EGQKRRNTL HEFKKSAKT
 51 LTKEDPLLKI KTKKVNSADE CANRCIRNRG FTFTCKAFVF DKSRRKCYWY
 101 PFNSMSSGVK KFGHEFDLY ENKDYIRNCI IGKGGSYKGT VSITKSGIKC
 151 QPWNSMIPHE HSFLPSSYRG KDLQENYCRN PRGEEGGPWC FTSNPEVRYE
 201 VCDIPQCSEV ECMTCN GESY RGPMDHTESG KTCQRWDQQT PHRHKFLPER
 251 YPDKGFDDNY CRNPDGKPRP WCYTLDPDTP WEYCAIKTCA HSAVNETDVP
 301 METTECIQGG GEGYRGTSNT IWNGIPCQRW DSQYPHKHDI TPENFKCKDL
 351 RENYCRNPDG AESPWCFTTD PNIRVGYSQ IPKCDVSSGQ DCYRGNKGY
 401 MGNLSKTRSG LTCSMWDKNM EDLHRHIFWE PDASKLNKNY CRNPDDDAHG
 451 PWCYTGNPLI PWDYCPISRC EGDTPPTIVN LDHPVISCAK TKQLRVVNGI
 501 PTQTTVGMV SLKYRNKHIC GGLIKESWV LTARQCFPAR NKDLKDYEAW
 551 LGIHDVHERG EEKQILNI SQLVYGEPS DLVLLKLARP AILDNFVSTI
 601 DLPSYGCTIP EKTTCYIYGW GYGLINADG LLRVAHLYIM GNEKCSQHHQ
 651 GKVTLNESEL CAGA EKIGSG PCEGDYGGPL ICEQHKMRMV LGVIVPGRGC
 701 AIPNRPGIFV RVAYYAKWIH KVILTYKL

5

HGF de rata (SEQ ID Nº:4)

[0038]

1 MWVTKLLPAL LLQHVLHL LLPIAIPYAE GHKRRNTIH EFKKSATTL
 51 IKIDPALKIK TTKVNTADQC ANRCTRNGL PFTCKAFVFD KARKQCLWFP
 101 FNSMSSGVK EFGHEFDLYE NKDYIRNCII GKGRSYKGTV SITKSGIKCQ
 151 PWSSMIPHEH SFLPSSYRGK DLQENYCRNP RGEEGGPWCF TSNPEVRYEV
 201 CDIPQCSEVE CMTCN GESYR GLMDHTESGK ICQRWDHQTP HRHKFLPERY
 251 PDKGFDDNYC RNPDGQPRPW CYTLDPHTRW EYCAIKTCAD NTVNDTDVPM
 301 ETTECIQGG EGYRG TANTI WNGIPCQRWD SQYPHKHDMT PENFKCKDLR
 351 ENYCRNPDGS ESPWCFTTDP NIRVGYSQI PNCDMMSGQD CYRGNKGYM
 401 GNLSQTRSGL TCSMWNKNME DLHRHIFWEP DASKLNENYC RNPDDDAHGP
 451 WCYTGNPLIP WDYCPISRCE GDTPTIVNL DHPVISCAKT KQLRVVNGIP
 501 TRTNVGMIS LRYRNKHICG GSLIKESWV TARQCFPSRD LKDYEAWLGI
 551 HDVHGRGEEK RKQVLNVSQV VYGEPSDLV LMKLARPAVL DDFVNTIDL
 601 NYGCTIPEKT SCSVYGWGYT GLINYDGLLR VAHLYIMGNE KCSQHHRGKV
 651 TLNESEICAG AEKIGSGPCE GDYGGPLVCE QHKMRMVLGV IVPGRGCAIP
 701 NRPGIFVRVA YYAKWIHKII LTYKVPES

10

ES 2 440 953 T3

HGFR HUMANO (SEQ ID N°:5)

[0039]

1 MKAPAVLAPG ILVLLFTLVQ RSNGECKEAL AKSEMNVNMK YQLPNFTAET
51 PIQNVILHEH HIFLGATNYI YVLNEEDLQK VAEYKTGPVL EHPDCFCPCQD
101 CSSKANLSSG VVKDNINMAL VVDTYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVFPNH
151 TADIQSEVHC IFSPQIEEPS QCPDCVVSAL GAKVLSSVKD RFINFFVGNT
201 INSSYFPDHP LHSISVRRLK ETKDGFMTL DQSYIDVLPE FRDSYPIKYV
251 HAFESNNFIY FLTQVRETLD AQTQFHTRIIR FCSINSLHS YMEMPLLECIL
301 TEKRKRSTK KEVFNILQAA YVSKPGAQLA RQIGASLNDD ILFGVFAQSK
351 PDSAEPMDRS AMCAFPKIVY NDFFNKIVNK NNVRLQHFY GPNHEHCFNR
401 TLLRNSSGCE ARRDEYRTEF TTALQRVDFL MGQFSEVLLT SISTFIKGD
451 TIANLGTSEG RFMQVVVSRG GPSTPHVNFV LDSPVSPVPEV IVEHTLNQNG
501 YTLVITGKKI TKIPLNGLGC RHFQSCSQCL SAPPFVQCGW CHDKCVRSEE
551 CLSGTWTQQI CLPAIKVFP NSAPLEGGTR LTICGWDFGF RRNNKFDLKK
601 TRVLLGNESC TLLSESTMN TLKCTVGPAM NKHFNMSSII SNGHGTQYS
651 TFSYVDPVIT SISPKYGPMA GGTLLTLTGN YLNSGNSRHI SIGGKTCTLK
701 SVSNSILECY TPAQTISTEF AVKLIKIDLAN RETSIFSYRE DPIVYEHPT
751 KSFISGGSTI TGVGKLNLSV SVPRMIVNVH EAGRNFVAC QHRNSSEIIC
801 CTTPSLQQLN LQLPLKTKAF FMLDGILSKY FDLIYVHNPV FKPFEKPVMI
851 SMGNENVLEI KGNIDPEAV KGEVLKVGNK SCENIHLHSE AVLCTVPNDL
901 LKLNSELNIE WKQAISSTVL GKVIVQPDQN FTGLIAGVVS ISTALLLLG
951 FFLWLKRRKQ IKDLGSELVR YDARVHTPHL DRLVSARSVS PTTEMVSNES
1001 VDYRATFPED QFPNSSQNGS CRQVQYPLTD MSPILTSQDS DISSPLLQNT
1051 VHIDLSALNP ELVQAVQHVV IGPSSLIVHF NEVIGRGHFG CVYHGTLLDN
1101 DGKKIHCAVK SLNRITDIGE VSQFLEGGI MKDFSHPNVL SLLGICLRSE
1151 GSPLVLPYM KHGDLRNFIR NETHNPTVKD LIGFGLQVAK GMKYLASKKF
1201 VHRDLAARNC MLDEKFTVKV ADFGLARDMY DKEYYSVHVK TGAKLPVKWM
1251 ALESQTQKF TTKSDVWSFG VLLWELMTRG APPYDPVNTF DITVYLLQGR
1301 RLLQPEYCPD PLYEVMLKCW HPKAEMRPSF SELVSRISAI FSTFIGEHYV
1351 HVNATYVNVK CVAPYPSLLS SEDNADDEVD TRPASFWETS

HGFR de chimpancé (SEQ ID N°:6)

5 [0040]

1 MKAPAVLAPG ILVLLFTLVQ RSNGECKEAL AKSEMNVNMK YQLPNFTAET
51 PIQNVILHEH HIFLGATNYI YVLNEEDLQK VAEYKTGPVL EHPDCFCPCQD
101 CSSKANLSSG VVKDNINMAL VVDTYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVFPNH
151 TADIQSEVHC IFSPQIEEPS QCPDCVVSAL GAKVLSSVKD RFINFFVGNT
201 INSSYFPDHP LHSISVRRLK ETKDGFMTL DQSYIDVLPE FRDSYPIKYV
251 HAFESNNFIY FLTQVRETLD AQTQFHTRIIR FCSINSLHS YMEMPLLECIL
301 TEKRKRSTK KEVFNILQAA YVSKPGAQLA RQIGASLNDD ILFGVFAQSK
351 PDSAEPMDRS AMCAFPKIVY NDFFNKIVNK NNVRLQHFY GPNHEHCFNR
401 TLLRNSSGCE ARRDEYRTEF TTALQRVDFL MGQFSEVLLT SISTFIKGD
451 TIANLGTSEG RFMQVVVSRG GPSTPHVNFV LDSPVSPVPEV IVEHTLNQNG
501 YTLVVTGKKI TKIPLNGLGC RHFQSCSQCL SAPPFVQCGW CHDKCVRSEE
551 CLSGTWTQQI CLPAIKVFP NSAPLEGGTR LTICGWDFGF RRNNKFDLKK
601 TRVLLGNESC TLLSESTMN TLKCTVGPAM NKHFNMSSII SNGHGTQYS
651 TFSYVDPVIT SISPKYGPMA GGTLLTLTGN YLNSGNSRHI SIGGKTCTLK
701 SVSNSILECY TPAQTISTEF AVKLIKIDLAN RETSIFSYRE DPIVYEHPT
751 KSFISTWWKE PLNIVSFLFC FASGGSTITG VGKLNLSVSV PRMIVNHEA
801 GRNFTVACQH RSNSEIICCT TPSLQQLNLQ LPLKTKAFFM LDGILSKYFD

ES 2 440 953 T3

851 LIYVHNPFVK PFEKPMISM GNEVLEIKG NDIDPEAVKG EVLKVGNKSC
 901 ENIHLHSEAV LCTVPNDLLK LNSELNIEWK QAISSTVLGK VIVQPDQNF
 951 GLIAGVVSIS IALLLLGGFF LWLKKRQIK DLGSELVRYD ARVHTPHLDR
 1001 LVSARSVSPT TEMVSNEVD YRATFPEDQF PNSSQNGSCR QVQYPLTDM
 1051 PILTSGSDI SSPLLQNTVH IDLSALNPEL VQAVQHVIG PSSLIVHFNE
 1101 VIGRGHFGCV YHGTLNDNG KKIHCVKSL NRITDIGEVS QFLTEGIIMK
 1151 DFSHPNVLSL LGICLRSEGS PLVVLPMKH GDLRNFIRNE THNPTVKDLI
 1201 GFGLQVAKGM KYLASKKFVH RDLAARNCML DEKFTVKVAD FGLARMDYDK
 1251 EYYSVHNKTG AKLPVKWML ESLQTQKFTT KSDVWSFGVL LWELMTRGAP
 1301 PYPDVNTFDI TVYLLQGRRL LQPEYCPDPL YEVMLKCWHP KAEMRPSFSE
 1351 LVSRISAFS TFIGEHYVHV NATYVNVKCV APYPSLLSSE DNADDEVDR
 1401 PASFWETS

HGFR de ratón (SEQ ID N°:7)

5 [0041]

1 MKAPTVLAPG ILVLLLSLVQ RSHGECKEAL VKSEMNVNMK YQLPNFTAET
 51 PIQNVVLHGH HIYLGATNYI YVLNDKDLQK VSEFKTGPVL EHPDCLPCR
 101 CSSKANSSGG VWKDNINMAL LVDTYYDQQL ISCGSVNRGT CQRHVLPDPN
 151 SADIQSEVHC MFSPEEESGQ CPDCVVSALG AKVLLSEKDR FINFFVGNIT
 201 NSSYPPGYSL HSISVRRLKE TQDGFKFLTD QSYIDVLPEF LDSYPIKYIH
 251 AFESNHFIYF LTVQKETLDA QTFHTRIIRF CSVDSGLHSY MEMPLECILT
 301 EKRRKRSTRE EVFNILQAAY VSKPGANLAK QIGASPSDDI LFGVFAQSKP
 351 DSAEPVNRSA VCAFPKIYVN DFFNKIVNKN NVRCLQHFYD PNHEHCFNRT
 401 LLRNSSGCEA RSDEYRTEFT TALQRVDLFM GRNQVLLTS ISTFIKGLT
 451 IANLGTSEGR FMQVVLRTA HLTPHVNFLL DSHPVSPVI VEHPSNQNGY
 501 TLVVTGKKIT KIPLNGLGCG HFQSCSQCLS APYFIQCGWC HNQCVRFDEC
 551 PSGTWTQEIC LPAVYKVFPPT SAPLEGGTVL TICGWDFGFR KNNKFDLRKT
 601 KVLLGNESCT LTLSESTTNT LKCTVGPAMS EHFNVSVIIS NSRETTQYSA
 651 FSYVDPVITS ISPRYGPQAG GTLLTLTGKY LNSGNSRHIS IGGKTCTLKS
 701 VSDSILECYT PAQTTSDEFP VKLKIDLANR ETSSFYSYRED PVVYEHPTK
 751 SFISGGSTIT GIGKTLNSVS LPKLVIDVHE VGVNYTVACQ HRSNSEIICC
 801 TTPSLKQLGL QLPLKTKAFF LLDGILSKHF DLYVHNPFV EPFEKPMIS
 851 MGNEVVEIK GNNIDPEAVK GEVLKVGNS CESLHWHSGA VLCTVPSDLL
 901 KLNSELNIEW KQAVSSTVLG KVIVQPDQNF AGLIIGAVSI SVVLLLSGL
 951 FLWMRKRKHK DLGSELVRYD ARVHTPHLDR LVSARSVSPT TEMVSNEVD
 1001 YRATFPEDQF PNSSQNGACR QVQYPLTDL S PILTSGSDI SSPLLQNTVH
 1051 IDLSALNPEL VQAVQHVIG PSSLIVHFNE VIGRGHFGCV YHGTLNDNG
 1101 KKIHCVKSL NRITDIEVS QFLTEGIIMK DFSHPNVLSL LGICLRSEGS
 1151 PLVVLPMKH GDLRNFIRNE THNPTVKDLI GFGLQVAKGM KYLASKKFVH
 1201 RDLAARNCML DEKFTVKVAD FGLARMDYDK EYYSVHNKTG AKLPVKWML
 1251 ESLQTQKFTT KSDVWSFGVL LWELMTRGAP PYPDVNTFDI TIYLLQGRRL
 1301 LQPEYCPDAL YEVMLKCWHP KAEMRPSFSE LVSRISAFS TFIGEHYVHV
 1351 NATYVNVKCV APYPSLLPSQ DNIDGEGNT

HGFR de rata (SEQ ID N°:8)

[0042]

```

1  MKAPTALAPG ILLLLLTLAQ RSHGECKEAL VKSEMNVNMK YQLPNFTAET
51  PIQNVVLHGH HIYLGATNYI YVLNDKDLQK VSEFKTGPVV EHPDCFPCQD
101 CSSKANVSGG VWKDNVNMAL LVDTYYDDQL ISCGSVNRGT CQRHVLPPDN
151 AADIQSEVHC MFSPLAEEES GQCPDCVUSA LGAKVLLSEK DRFINFFVGN
201 TINSSYPPDY SLHSISVRRL KETQDGFKFL TDQSYIDVLG EFRDSYPIKY
251 IHAFESNHFI YFLTVQKETL DAQTFHTRII RFCSVDSGLH SYMEMPLECI
301 LTEKRRKRST REEVFNILQA AYVSKPGANL AKQIGASPYD DILYGVFAQS
351 KPDSAEPMNR SAVCAFPIKY VNDFFNKIVN KNNVRCLQHF YGPNHEHCFN
401 RTLLRNSSGC EVRSDEYRTE FTTALQAVDL FMGRLNHVLL TSISTFIKGD
451 LTIANLGTSE GRFMQVLSR TAHFTPHVNF LLDShpvspe VIVEHPSNQN
501 GYTLVVTGKK ITKIPLNGLG CGHFQSCSQC LSAPYFIQCG WCHNRCVHSN
551 ECPSGTWQOE ICLPAVYKVF PTSAPLEGGT MLTICGWDFG FKKNNKFDLR
601 KTKVLLGNES CTLTLSESTT NTLKCTVGPA MSEHFNVSVI VSNSRETTQY
651 SAFSYVDPVI TSISPRYGPH AGGTLTLTG KYLNSGNSRH ISIGGKTCTL
701 KSVSDSILEC YTPGHTVSAE FPVCLKIDLA DRVTSSFSYG EDPFVSEIHP
751 TKSFISSGST ITGIGKNLNS VSTPKLVIEV HDVGVNYTVA CQHRSSSEII
801 CCTTPSLQQL DLQLPLKTKA FFLLDGILSK HFDLTYVHDP MFKPFEKPMV
851 ISMGNNENVVE IKGDDIDPEA VKGEVLKVGK KSCENLHWHS EALLCTVPSD
901 LLKLNNGELN IEWKQAVSST VLGKVIVQPD QNFAGLIIGA VSISVVLLV
951 SGLFLWLRKR KHKDLGSELV RYDARVHTPH LDRLVSARSV SPTTEMVSNE
1001 SVDYRATFPE DQFPNSSQNG ACRQVQYPLT DLSPILTSGD SDISSPLLQN
1051 TVHIDLALN PELVQAVQHV VIGPSSLIVH FNEVIGRGHF GCVYHGTLDD
1101 SDGKKIHCAV KSLNRITDIE EVSQFLTEGI IMKDFSHPNV LSLLGICLRS
1151 EGSPLVVLPY MKHGDLRNFI RNETHNPTVK DLIGFGLQVA KGMKYLASKK
1201 FVHRDLAARN CMLDEKFTVK VADFLGARM YDKEYYSVHN KTGAKLPVKW
1251 MALESQTQK FTTKSDVWSF GVLLWELMTR GAPPYPDVNT FDITIIYLLQG
1301 RRLQLPEYCP DALYEVMLKC WHPKAEMRPS FSELVSRIS IFSTFIGEHY
1351 VHVNATYVNV KCVAPYPSLL PSQDNIDGEA NT
    
```

5 [0043] Regiones ilustrativas del HGFR incluyen:

- Región 52..487
/region_name="semaphorin domain"
/note="Sema"
/db_xref="CDD:25341"
- Región 519..561
/region_name="domain found in Plexins, Semaphorins and Integrins"
/note="PSI"
/db_xref="CDD:25325"
- Región 563..656
/region_name="First repeat of the IPT domain of Plexins and Cell Surface Receptors (PCSR)"
/note="IPT_plexin_repeat1"
/db_xref="CDD:27712"
- Región 657..740
/region_name="Second repeat of the IPT domain of Plexins and Cell Surface Receptors (PCSR)"

/note="IPT_plexin_repeat2"
/db_xref="CDD:27711"

Región 742..837
/region_name="Third repeat of the IPT domain of Plexins
and Cell Surface Receptors (PCSR)"
/note="IPT_plexin_repeat3"
/db_xref="CDD:27713"

Región 839..932
/region_name="IPT domain of Plexins and Cell Surface
Receptors (PCSR) and related proteins"
/note="IPT_PCSR"
/db_xref="CDD:27705"

5 [0044] En algunos aspectos, HGF, y fragmentos biológicamente activos del mismo se proporcionan como polipéptidos purificados. Los polipéptidos purificados incluyen polipéptidos generados *in vitro* (p.ej., por traducción *in vitro* o por el uso de un sintetizador automatizado de polipéptidos) y polipéptidos que se expresaron inicialmente en una célula (p.ej., una célula procariota, una célula eucariota, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula de planta) y posteriormente purificados. Las células que expresan un polipéptido purificado pueden incluir células que codifican un gen endógeno, células transducidas con un vector de expresión que codifica un polipéptido, y células que están manipuladas de forma experimental para inducir la expresión de un gen endógeno que no se expresa usualmente en ese tipo de célula (p.ej., tecnología de activación génica). En algunos aspectos, los polipéptidos son proteínas de fusión (p.ej., una fusión de glutatión S-transferasa de HGFR) que puede incluir un sitio de escisión de proteasa para permitir la escisión y separación de la proteína de fusión en polipéptidos separados. En algunos aspectos, un polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos que facilita la purificación del polipéptido (p.ej., una etiqueta histidina múltiple, una etiqueta FLAG, etc.). Entre los métodos para aislar proteínas a partir de células o polipéptidos que las células expresan, se incluyen: purificación de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía líquida de alta eficacia y otros métodos de purificación cromatográfica. Los polipéptidos se pueden modificar después de la traducción, p.ej., mediante glicosilación.

20 [0045] El HGF purificado (p.ej., HGF humano purificado) puede obtenerse a partir de células de mamíferos transfectadas de modo estable con un ADNc que codifica el polipéptido HGF humano enumerado en este documento como SEQ ID N°: 2 y que secreta el HGF maduro como se describe, p.ej., en la patente de EE. UU. 5.686.292 concedida a Schwall, o Naka *et al.*, *Journal of Biol. Chem.*, 267(28):20114-20119, (1992). En algunos aspectos, el HGF puede ser una variante de cadena única que carece de actividad del mitógeno pero retiene la unión al receptor de alta afinidad, como se describe en Lokker *et al*, *EMBO J.*, 11(7):2503-2510, (1992).

II. Moduladores HGF/HGFR HGFR y HGF

25 [0046] Se puede utilizar una variedad de agentes como un modulador del HGF/HGFR para tratar patologías relacionadas con el sistema linfático, p.ej., linfedema inducido, linfangiomas, linfangiogenesis tumoral o metástasis del tumor. El agente puede ser cualquier tipo de compuesto que puede administrarse al sujeto (p.ej., anticuerpos, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, péptidos miméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la traducción y de la transcripción y similares). En un aspecto, el modulador del HGF/HGFR es uno biológico, p.ej., una proteína que tiene un peso molecular de entre 5 y 300 kDa.

35 [0047] Por ejemplo, un modulador del HGF/HGFR puede inhibir la unión del HGF a un HGFR o puede prevenir la activación del NF- κ B mediada por el HGF. Un modulador del HGF/HGFR típico puede unirse a HGFR, p.ej., una variante de cadena única del HGF que carece de actividad mitogénica pero que retiene unión del receptor de alta afinidad (véase, p.ej., Lokker *et al*, *EMBO J.*, 11(7):2503-2510, (1992)). Un modulador del HGF/HGFR que se une a HGF puede alterar la configuración del HGF, dificultar la unión de HGF a HGFR o, por el contrario, disminuir la afinidad de HGF para un HGFR o impedir la interacción entre HGF y un HGFR.

40 [0048] Un modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo) puede unirse a HGF o a un HGFR con un K_d de menos de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o 10^{-10} M. En un aspecto, el modulador del HGF/HGFR se une a HGF con una afinidad al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 1000 veces mejor que su afinidad para el factor de crecimiento de hepatocitos/proteína de estimulación del macrófago (HGF1/MSP). En un aspecto, el modulador del HGF/HGFR se une a HGF o HGFR con una afinidad al menos 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 1000 veces mejor que su afinidad para el receptor estimulante 1 del macrófago (RON) (p.ej., NP_002438). Un modulador del HGF/HGFR preferido se une específicamente a HGF o HGFR, como un anticuerpo específico de HGF o HGFR.

45 [0049] Entre las moléculas de proteínas HGF de ejemplo se incluyen: HGF humana (p.ej., NP_001010932, mostrado como SEQ ID N°: 1)), HGF de chimpancé (p.ej., XP_519174, presentado como SEQ ID N°2), HGF de ratón (p.ej.,

CAA51054, mostrado como SEQ ID N°:3) y HGF de rata (p.ej., 1602237A, presentado como SEQ ID N°4). También se incluyen proteínas que incorporan una secuencia de aminoácidos al menos 90, 92, 95, 97, 98, 99% idéntica y completamente idéntica a la región madura procesada de las proteínas HGF mencionadas anteriormente (p.ej., una secuencia de aminoácidos al menos 90, 92, 95, 97, 98, 99% idéntica o completamente idéntica a los aminoácidos 25-1390 de la SEQ ID N°: 1 y proteínas codificadas por un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de alta astringencia a un gen humano, de chimpancé, de ratón o rata que codifica una proteína HGF de origen natural. Preferentemente, una proteína HGF, en su forma madura procesada, es capaz de proporcionar al menos una actividad de HGF, p.ej., la unión al HGFR.

[0050] Los cálculos de la “homología” o “identidad de secuencia” entre dos secuencias (los términos se utilizan de modo intercambiable) se realizan como se indica a continuación. Las secuencias se alinean para una comparación óptima (p.ej., pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden desestimarse con propósitos comparativos). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación empleando el programa GAP en el paquete informático GCG con un matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por hueco extendida de 4 y una penalización por hueco de marco de lectura de 5. Después, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en los sitios de aminoácidos o sitios de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza aquí el término “identidad” de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a “homología” de aminoácido o de ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

[0051] Como se utiliza en el presente documento, el término “hibridar en condiciones de alta astringencia” describe condiciones para la hibridación y el lavado. Puede encontrarse una guía para llevar a cabo reacciones de hibridación en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En esta fuente de referencia se describen métodos acuosos y no acuosos y pueden utilizarse ambos. Las condiciones de hibridación de alta astringencia incluyen hibridación en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1% SDS a 65 °C, o condiciones prácticamente similares.

[0052] Entre los moduladores de HGF/HGFR se incluyen anticuerpos que se unen a HGF o HGFR y formas solubles del HGFR que compiten con el HGFR de superficie celular para la unión a HGF. Un ejemplo de una forma soluble del HGFR es una proteína de fusión Fc que incluye al menos una parte del dominio extracelular de HGFR (p.ej., un fragmento soluble de unión al HGF de HGFR), denominado HGFR-Fc (véase, p.ej., Mark *et al.*, *Journal of Biol. Chem.*, 267(36):26166-26171, (1992)). También pueden utilizarse otras formas solubles del HGFR, p.ej., formas que no incluyen dominio Fc. Los moduladores del HGF/HGFR del anticuerpo se detallan más adelante. Otros tipos de moduladores de HGF/HGFR, p.ej., moléculas pequeñas, ácido nucleico o aptómeros de ácido nucleico y péptidos pueden aislarse mediante el cribado, p.ej., como se describe en Jhaveri *et al. Nat. Biotechnol.* 18:1293 y la patente de EE. UU. 5.223.409. En la patente de EE. UU. N°: 6.468.529 concedida a Schwall *et al.* se describen ensayos de ejemplo para determinar si un agente se une a HGF o HGFR y para determinar si un agente modula una interacción de HGF/HGFR.

[0053] Una forma soluble de ejemplo de la proteína HGFR incluye una región de la proteína HGFR que se une al HGF, p.ej., un dominio extracelular, p.ej. un dominio en una región extracelular. Esta región puede asociarse físicamente, p.ej., fusionarse a otra secuencia de aminoácidos, p.ej., un dominio Fc, y su extremo N o C-terminal. La región procedente del HGFR puede separarse mediante un enlace de la secuencia de aminoácidos heteróloga. Michieli *et al.* (2005), *Cancer Cell*, 6:61-73, describe una proteína de fusión del HGFR ilustrativa.

A. Anticuerpos

[0054] Los moduladores del HGF/HGFR de ejemplo incluyen anticuerpos que se unen a HGF y/o HGFR. En un aspecto, el anticuerpo inhibe la interacción entre HGF y un HGFR, p.ej., mediante el bloqueo físico de la interacción, la reducción de la afinidad del HGF y/o HGFR con su equivalente, la alteración o desestabilización de complejos del HGF, la inhibición del HGF o un HGFR o dirigiendo HGF o HGFR para la degradación. En un aspecto, el anticuerpo puede unirse a HGF o HGFR en un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos que participan en la interfaz de unión del HGF/HGFR. Estos residuos de aminoácidos pueden identificarse, p.ej., mediante escaneo de alanina. En otro aspecto, el anticuerpo puede unirse a los residuos que no participan en la unión de HGF/HGFR. Por ejemplo, el anticuerpo puede alterar una configuración de HGF o HGFR y, por tanto, reducir la afinidad de unión, o el anticuerpo puede impedir de modo estérico la unión de HGF/HGFR. El anticuerpo puede unirse a la subunidad α o la subunidad β del HGF.

[0055] Además de los anticuerpos que se unen a HGF y/o HGFR, pueden utilizarse otros anticuerpos. En un aspecto, el anticuerpo puede evitar la activación de una actividad o evento mediado por el HGF/HGFR. Por ejemplo, es posible utilizar un anticuerpo para integrina $\alpha 9$, aumentada por HGF. Por ejemplo, determinados anticuerpos para $\alpha 9$ pueden inhibir la migración inducida del HGF de células.

[0056] Como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” hace referencia a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, p.ej., una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en este documento como VH) y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en este documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El término “anticuerpo” abarca fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos (p.ej., anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos, p.ej., inmunoglobulinas intactas y/o de longitud completa de los tipos IgA, IgC (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipo kappa o lambda. En un aspecto, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser útil para la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o citotoxicidad mediada por complementos, o puede no ser útil para una o ambas actividades.

[0057] Además las regiones VH y VL pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (“CDR”), intercaladas con regiones que están más conservadas, conocidas con el término “regiones estructurales” (FR). La extensión de las regiones FR y CDR ha sido descrita con precisión (véase, p.ej., Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, US Department of Health and Human Services, Publicación del Instituto Nacional de la Salud. Núm. 91-3242; y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En este documento se utilizan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL está compuesta normalmente de tres CDR y cuatro FR, ordenadas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3. FR4.

[0058] Un “dominio inmunoglobulínico” hace referencia a un dominio del dominio variable o constante de moléculas de inmunoglobulina. Los dominios inmunoglobulínicos normalmente contienen dos láminas β formadas de aproximadamente siete cadenas β, y un enlace de disulfuro conservado (véase, p.ej., A. F. Williams y A. N. Barclay (1988) *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405). Una “secuencia de dominio variable de inmunoglobulina” se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar una estructura válida para posicionar las secuencias de CDR en una conformación adecuada para la unión al antígeno. Por ejemplo, la secuencia puede incluir toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos de extremo N- o C- terminal, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales o puede incluir otras alteraciones. En un aspecto, un polipéptido que incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión diana (o “sitio de unión al antígeno”), p.ej., una estructura que interacciona con HGF o HGFR.

[0059] La cadena VH o VL del anticuerpo también puede incluir toda o parte de la región constante de cadena pesada o ligera, para de este modo formar una cadena inmunoglobulínica pesada o ligera, respectivamente. En un aspecto, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras. Las cadenas de inmunoglobulinas pesada y ligera se pueden unir con enlaces de disulfuro. La región constante de cadena pesada incluye normalmente tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera normalmente abarca un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median normalmente la unión del antígeno a factores o tejidos huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (p.ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complementos clásicos.

[0060] Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas, efectivamente humanas o humanizadas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR, p.ej., CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC pueden ser humanas. Cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. CDR3 de HC puede ser humana. Una o más regiones estructurales pueden ser humanas, p.ej., FR1, FR2, FR3 Y FR4 de la cadena pesada (HC) o de la cadena ligera (LC). En un aspecto, todas las regiones estructurales son humanas, p.ej., procedentes de una célula somática humana, p.ej., una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En un aspecto, las secuencias humanas son secuencias de línea germinal, p.ej., codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. Una o más regiones constantes pueden ser humanas, efectivamente humanas o humanizadas. En otro aspecto, al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 o 98% de las regiones estructurales (p.ej., FR1, FR2 y FR3, en conjunto, o FR1, FR2, FR3 y FR4, en conjunto) o el anticuerpo completo pueden ser humanos, efectivamente humanos o humanizados. Por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 colectivamente pueden ser al menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 o 98% idénticas, o completamente idénticas, a una secuencia humana codificada por un segmento de línea germinal humano.

[0061] Una región variable de inmunoglobulina “eficazmente humana” es una región variable de inmunoglobulina que induce un número suficiente de posiciones de aminoácidos estructurales humanas de modo que la región variable de inmunoglobulina no obtiene una respuesta inmunogénica en un humano normal. Un anticuerpo “eficazmente humano” es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanas de modo que el anticuerpo no produce una respuesta inmunogénica en un humano normal.

[0062] Una región variable de inmunoglobulina “humanizada” es una región variable de inmunoglobulina que está modificada de modo que la forma modificada produce una respuesta inmunitaria menor en un humano que una forma no modificada, p.ej., se modifica para incluir un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanas estructurales de modo que la región variable de inmunoglobulina no produce una respuesta inmunogénica en un humano normal. Las descripciones de inmunoglobulinas “humanizadas” se incluyen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. núms. 6.407.213 y 5.693.762. En algunos casos, las inmunoglobulinas humanizadas pueden incluir un aminoácido no humano en una o más posiciones de aminoácidos estructurales.

[0063] Los anticuerpos que se unen a HGF o a un HGFR pueden generarse a través de una gran variedad de métodos, incluida la inmunización, p.ej., usando un animal, o métodos *in vitro* como la presentación en fagos. Se puede utilizar todo o parte del HGF o HGFR como inmunógeno o como diana para la selección. Por ejemplo, se puede utilizar el HGF o un fragmento del mismo, o HGFR o un fragmento del mismo, como inmunógeno. En un aspecto, el animal inmunizado contiene inmunoglobulina que produce células con locus natural de inmunoglobulina parcialmente humana o humana. En un aspecto, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humano. Por ejemplo, es posible modificar genéticamente cadenas de ratón con déficit en la producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes del locus de Ig humana. En consecuencia, utilizando tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse anticuerpos monoclonales específicos al antígeno, al menos parcialmente humanos, con la especificidad deseada. Véase, p.ej., XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) *Nat. Gen.* 7:13-21; EE. UU. 2003-0070185; patente de EE. UU. núm. 5.789.650 y WO 96/34096.

[0064] También pueden producirse los anticuerpos no humanos para HGF o HGFR, p.ej., en un roedor. El anticuerpo no humano puede humanizarse, p.ej., como se describe en EP 239 400; patentes de EE. UU. núms. 6.602.503; 5.693.761 y 6.407.213, desinmunizados o modificados de otro modo para hacerlos eficazmente humanos.

[0065] EP 239 400 (Winter *et al.*) describe la alteración de anticuerpos mediante sustitución (en una región variable dada) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) para una especie con los de otra. Normalmente, las CDR de un anticuerpo no humano (p.ej., murino) se sustituyen en las regiones correspondientes en un anticuerpo humano mediante el uso de tecnología de ácido nucleico recombinante para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Pueden añadirse segmentos génicos de región constante humana del isotipo deseado (normalmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes de cadena ligera y pesada humanizados pueden coexpresarse en células de mamíferos para producir anticuerpo humanizado soluble. También pueden utilizarse otros métodos para humanizar anticuerpos. Por ejemplo, otros métodos pueden explicar a estructura tridimensional del anticuerpo, posiciones de la estructura que están próximas a la estructura tridimensional para enlazar secuencias de péptidos de inmunógeno y determinantes. Véase, p.ej., WO 90/07861; patentes de EE. UU. núms. 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089 y 5.530.101; Tempest *et al.* (1991) *Biotechnology* 9:266-271 y la patente de EE. UU. núm. 6.407.213.

[0066] Los anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen a HGF y HGFR pueden producirse, p.ej., usando esplenocitos humanos estimulados *in vitro*, como se describe en Boerner *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:86-95. Pueden estar preparados mediante clonación de repertorio descrita por Persson *et al.* (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci.* EE. UU. 88:2432-2436 o por Huang y Stollar (1991) *J. Immunol. Methods* 141:227-236; también en la patente de EE. UU. núm. 5.798.230. También pueden utilizarse las grandes bibliotecas de expresión en fago humano no inmunizados para aislar anticuerpos de alta afinidad que se pueden desarrollar como terapia humana empleando tecnología de fagos estándar (véase, p.ej., Hoogenboom *et al.* (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom *et al.* (2000) *Immunol Today* 2:371-378; y EE. UU. 2003-0232333).

[0067] Los anticuerpos y otras proteínas descritas en el presente documento pueden producirse en células procariontas y eucariotas. En un aspecto, los anticuerpos (p.ej., los de scFv) se expresan en una célula de levadura como *Pichia* (véase, p.ej., Powers *et al.*, (2001) *J. Immunol. Methods* 251: 123- 35), *Hanseula*, o *Saccharomyces*.

[0068] Los anticuerpos, en concreto los anticuerpos de longitud completa, p.ej., IgG, pueden ser producidos en células de mamíferos. Entre las células huésped de mamíferos de ejemplo para la expresión recombinante se incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas células CHO negativas de dihidrofolato-reductasa, descritas en Urlaub y Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE. UU. 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección de DHFR, p.ej., como se describe en Kaufman y Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), líneas celulares linfocíticas, p.ej., células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, K562 y una célula procedente de un animal transgénico, p.ej., un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula puede ser una célula epitelial de mamífero.

[0069] Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores de expresión recombinante pueden transportar secuencias de ácido nucleico adicionales, como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (p.ej., orígenes de replicación) y genes de marcador de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, p.ej., las patentes de EE. UU. núms.. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017. Entre los genes marcadores de selección se

incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped *dhfr* con amplificación/selección con metotrexato) y el gen *neo* (para la selección de G418).

5 **[0070]** En un sistema ilustrativo para la expresión recombinante de un anticuerpo (p.ej., un anticuerpo de longitud completa o una parte de unión al antígeno del mismo), un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO *dhfr* por transfección mediada por fosfato de calcio. En el vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están enlazados de modo funcional a los elementos reguladores del potenciador/promotor (p.ej., derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, como un elemento regulador del potenciador del CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador del potenciador del SV40/promotor de AdMLP) para dirigir niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando amplificación/selección con metotrexato. Se cultivan las células transformantes seleccionadas para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se utilizan las técnicas de biología molecular clásicas para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar para transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo procedente del medio de cultivo. Por ejemplo, se pueden aislar algunos anticuerpos a través de cromatografía de afinidad con una proteína A o proteína G.

10 **[0071]** Los anticuerpos (y fusiones Fc) también pueden incluir modificaciones, p.ej., modificaciones que alteran la función del Fc, p.ej., para disminuir o eliminar la interacción con un receptor de Fc o con C1q, o con ambos. Por ejemplo, puede mutarse la región constante de la IgG1 humana en uno o más residuos, p.ej., uno o más de los residuos 234 y 237, p.ej., según la numeración en la patente de EE. UU. núm. 5.648.260. Otras modificaciones de ejemplo incluyen aquellas descritas en la patente de EE. UU. núm. 5.648.260.

15 **[0072]** Para algunas proteínas que incluyen un dominio Fc, se puede diseñar un sistema de producción de proteínas/anticuerpos para sintetizar anticuerpos u otras proteínas en las que la región de Fc está glicosilada. Por ejemplo, el dominio Fc de moléculas de IgG está glicosilado a asparagina 297 en el dominio CH2. El dominio Fc puede incluir también otras modificaciones eucariotas tras la traducción. En otros casos, la proteína se produce en una forma que no está glicosilada.

20 **[0073]** También pueden producirse anticuerpos y otras proteínas a través de un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de EE. UU. núm. 5.849.992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de leche y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés, p.ej., un anticuerpo descrito en el presente documento, y una secuencia señal para la secreción. La leche producida por las hembras de dichos mamíferos transgénicos incluye, secretada en la misma, la proteína de interés, p.ej., un anticuerpo o proteína de fusión de Fc. La proteína puede ser purificada a partir de la leche o utilizada directamente para algunas aplicaciones.

25 **[0074]** Los métodos descritos en el contexto de los anticuerpos pueden adaptarse a otras proteínas, p.ej., fusiones de Fc y fragmentos del receptor solubles.

B. Variantes del HGF

30 **[0075]** En algunos aspectos, las proteínas HGF pueden ser variantes del HGF que son resistentes a la escisión proteolítica por enzimas que son capaces de la conversión *in vivo* del HGF en su forma de dos cadenas. Las variantes se estabilizan preferentemente en forma de cadena única por mutagénesis dirigida al sitio en una región reconocida por una enzima capaz de convertir HGF en su forma de dos cadenas. Estas variantes de HGF retienen la afinidad de unión al receptor sustancialmente completo del HGF de tipo salvaje correspondiente, pero no activan el HGFR. En un aspecto, las variantes del HGF pueden presentar afinidad de unión mejorada al receptor en relación con el HGF de tipo salvaje correspondiente, pero incapaces de activar el HGFR. Estos compuestos son antagonistas competitivos del HGF de tipo salvaje correspondiente y, cuando están presentes en suficiente concentración, son capaces de inhibir la unión del HGF de tipo salvaje al HGFR. Véase, p.ej., Lokker *et al*, *EMBO J.*, 11(7):2503-2510, (1992) y la patente de EE. UU. núm. 5.316.921 concedida a Godowski *et al*.

C. Péptidos

35 **[0076]** En algunos aspectos, el modulador del HGF/HGFR puede ser un péptido de 32 o menos aminoácidos que se une independientemente a una molécula diana (p.ej., HGFR), pero no la activa. Algunos de estos péptidos pueden incluir uno o más enlaces de disulfuro. Otros péptidos, llamados "péptidos lineales", carecen de cisteínas. En un aspecto, los péptidos son artificiales, es decir, no están presentes en la naturaleza o no están presentes en una proteína codificada por uno o más genomas de interés, p.ej., el genoma humano. Los péptidos sintéticos pueden tener poca o no tener estructura en solución (p.ej., desestructurados), estructuras heterogéneas (p.ej., conformaciones alternativas o "estructurados holgadamente) o una estructura nativa singular (p.ej., plegado cooperativamente). Algunos péptidos sintéticos adoptan una estructura particular cuando están enlazados a una molécula diana. Algunos péptidos sintéticos de ejemplo son denominados "péptidos cíclicos" que tienen al menos un

enlace de disulfuro y, por ejemplo, un bucle de aproximadamente 4 a 12 residuos que no son de cisteína. Los péptidos ilustrativos son de menos de 28, 24, 20 o 18 aminoácidos de longitud.

5 **[0077]** Las secuencias de péptidos que se unen independientemente a HGFR pueden identificarse con una gran variedad de métodos. Por ejemplo, pueden seleccionarse de una biblioteca de expresión o una diversidad de péptidos. Después de la identificación, estos péptidos pueden producirse de modo sintético o a través de medios recombinantes. Las secuencias pueden ser incorporadas (p.ej., insertadas, añadidas o unidas) a secuencias más largas.

10 **[0078]** Las técnicas presentadas en Kay *et al.*, *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual* (Academic Press, Inc., San Diego 1996) y la patente de EE. UU. número 5.223.409 son útiles para preparar una biblioteca de enlazadores potenciales que se corresponden con la plantilla de tipo parental seleccionada. Las bibliotecas de expresión de péptidos pueden prepararse según dichas técnicas, y escanearse para encontrar péptidos que se unen al HGFR y lo inhiben.

15 **[0079]** Además, se pueden contraseleccionar las bibliotecas de fagos o las poblaciones seleccionadas procedentes de bibliotecas de fagos, p.ej., mediante contraselección con un dominio de unión al HGFR que carece de un dominio de SEMA (semaforina) o un dominio de PSI (plexina/semaforina/integrina), ambos contribuyen a la unión al HGF. Estos procedimientos pueden utilizarse para descartar los péptidos que no contactan el sitio de unión al HGF.

20 **[0080]** También pueden sintetizarse los péptidos usando estructuras principales alternativas, p.ej., una estructura principal de peptoide, p.ej., para producir un compuesto que ha aumentado la resistencia a la proteasa. En concreto, este método puede utilizarse para producir un compuesto que se une al HGFR o que inhibe su activación y que no presenta escisión, p.ej., por proteasas de suero.

25 **[0081]** Un polipéptido que inhibe la activación del HGFR puede asociarse con (p.ej., conjugarse a) un polímero, p.ej., polímeros sustancialmente no antigénicos, como óxidos de polialquileno o óxidos de polietileno. Los polímeros adecuados variarán sustancialmente de peso. Pueden utilizarse polímeros con un peso medio de número molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 (o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000 y de 2.000 a aproximadamente 12.500). Se pueden unir muchos fragmentos de polímero a un polipéptido, p.ej., al menos dos, tres o cuatro de esos fragmentos, p.ej., que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 a 7.000 Daltons.

30 **[0082]** Por ejemplo, el polipéptido puede conjugarse a un polímero hidrosoluble, p.ej., polímeros hidrófilos polivinilos, p.ej., alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Una lista que no se limita a estos polímeros incluye homopolímeros de óxido de polialquileno como el polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxi-etilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloque de los mismos, siempre y cuando se mantenga la hidrosolubilidad de los copolímeros en bloque. Entre los polímeros útiles adicionales se incluyen polioxi-alquilenos, como el polioxi-etileno, el polioxi-propileno y los copolímeros en bloque de polioxi-etileno y polioxi-propileno (Pluronic); los polimetacrilatos; los carbómeros; los polisacáridos ramificados o no ramificados que incluyen los monómeros de sacáridos D-manosa, D- y L-galactosa, fucosa, fructosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico, ácido siálico, ácido D-galacturónico, ácido D-manurónico (p.ej., ácido polimanurónico o ácido algínico), D-glucosamina, D-galactosamina, D-glucosa y ácido neuramínico, incluyendo los homopolisacáridos y heteropolisacáridos como la lactosa, la amilopectina, el almidón, el hidroxietil almidón, la amilosa, el sulfato dextrano, el dextrano, las dextrinas, el glucógeno o la subunidad de polisacárido de los mucopolisacáridos ácidos, p.ej., ácido hialurónico; polímeros de azúcares alcohólicos como el polisorbitol y el polimanol; la heparina o el heparón.

35 **[0083]** También pueden unirse otros compuestos al mismo polímero, p.ej., una citotoxina, un marcador u otro agente de direccionamiento o un agente no relacionado. También se pueden utilizar para entrecruzamiento los óxidos de polialquileno (PAO) terminados en alcoxi y monoactivados, p.ej., polietilenglicoles terminados en monometoxi (mPEG); polímeros terminados en alquilo C₁₋₄ y óxidos de polietileno bis-activados (glicoles). Véase, p.ej., la patente de EE. UU. 5.951.974.

D. Antagonistas de ácido nucleico

40 **[0084]** En determinadas realizaciones, se usan antagonistas del ácido nucleico para disminuir la expresión de un gen endógeno que codifica el HGF, un HGFR, integrina $\alpha 9$ o estaniocalcina 1. En un aspecto, el antagonista de un ácido nucleico es un ARNip que dirige el ARNm que codifica el HGF o un HGFR. También se pueden utilizar otros tipos de ácidos nucleicos antagonistas, p.ej., ARN de doble hebra, una ribozima, un formador de triple hélice o un ácido nucleico antisentido. En algunos aspectos, los antagonistas de ácidos nucleicos pueden dirigirse a dianas efectoras posteriores de activación del HGFR (p.ej., integrina $\alpha 9$ humana, una secuencia ilustrativa que se enumera en la colección del Genbank núm. NM_002207).

55 **[0085]** Los ARNip son ARN de doble cadena pequeños (ARNdc) que opcionalmente incluyen salientes. Por ejemplo, la región dúplex de un ARNip tiene aproximadamente de 18 a 25 nucleótidos de longitud, p.ej., de aproximadamente

19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud. Normalmente, las secuencias del ARNip son exactamente complementarias al ARNm diana. Los ARNdc y los ARNip en particular pueden utilizarse para silenciar la expresión génica en células de mamíferos (p.ej., células humanas). Los ARNip también incluyen los ARN horquillados cortos (ARNhc) con tallos de 29 pares de bases y salientes en el extremo 3' de 2 nucleótidos. Véase Clemens *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 97:6499-6503; Billy *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 98:14428-14433; Elbashir *et al.* (2001) *Nature*. 411:494-8; Yang *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 99:9942-9947; Siolas *et al.* (2005), *Nat. Biotechnol.* 23(2):227-31; 20040086884; EE. UU. 20030166282; 20030143204; 20040038278 y 20030224432.

[0086] Los agentes antisentido pueden incluir, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleótidos), p.ej., de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases, o de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nucleobases. Entre los compuestos antisentido se incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencias guías externas (EGS) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los compuestos antisentido pueden incluir un tramo de al menos 8 nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen diana. Un oligonucleótido no necesita ser el 100% complementario a su secuencia diana de ácido nucleico para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para producir una pérdida de utilidad, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias diferentes de la diana en condiciones en las que se necesita una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos.

[0087] La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm (p.ej., un ARNm que codifica el HGF o HGFR) puede interferir con una o más de las funciones normales del ARNm. Las funciones del ARNm que se van a interferir incluyen todas las funciones clave como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de proteínas procedentes del ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARN y actividad catalítica a la que se puede dedicar el ARN. La unión de proteínas específicas al ARN también puede llevarse a cabo por hibridación de los oligonucleótidos antisentido con el ARN.

[0088] Los compuestos antisentido ilustrativos incluyen secuencias de ARN o ADN que hibridan específicamente con el ácido nucleico diana, p.ej., el ARNm que codifica el HGF o HGFR. La región complementaria puede prolongarse de entre aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas. Las nucleobases modificadas pueden incluir, p.ej., pirimidinas 5-sustituidas como 5-iodouracilo, 5-iodocitosina y C5-propinilo pirimidinas como C5-propinilcitosina y C5-propiniluracilo. Otras nucleobases modificadas adecuadas incluyen: N⁴-(C₁-C₁₂) alquilaminocitocinas y N⁴,N⁴-(C₁-C₁₂) dialquilaminocitocinas. Las nucleobases modificadas también pueden incluir: 8-aza-7-deazapurinas 7-sustituidas y 7-deazapurinas 7-sustituidas como 7-iodo-7-deazapurinas, 7-ciano-7-deazapurinas, 7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Ejemplos de estas incluyen 6-amino-7-iodo-7-deazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-deazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-iodo-7-deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-ciano-7-deazapurinas, y 2-amino-6-hidroxi-7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Además, N⁶-(C₁-C₁₂) alquilaminopurinas y N⁶,N⁶-(C₁-C₁₂) dialquilaminopurinas, incluidas N⁶-metilaminoadenina y N⁶,N⁶-dimetilaminoadenina son también nucleobases modificadas adecuadas. De modo similar, otras purinas 6-sustituidas incluyendo, por ejemplo, 6-tioguanina pueden constituir nucleobases modificadas apropiadas. Otras nucleobases adecuadas incluyen 2-tiouracilo, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina y 2-fluoroguanina. También son apropiados los derivados de cualquiera de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente. Entre los sustituyentes de cualquiera de los compuestos precedentes se incluyen: alquilo C₁-C₃₀, alquenilo C₂-C₃₀, alquinilo C₂-C₃₀, arilo, aralquilo, heteroarilo, halo, amino, amido, nitro, tio, sulfonilo, carboxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, alcocarbonilo y similares.

[0089] Las descripciones de otros tipos de agentes de ácido nucleico también están disponibles. Véase, p.ej., las patentes de EE. UU. núms. 4.987.071 5.116.742 y 5.093.246; Woolf *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*; *Antisense RNA and DNA*, D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); 89:7305-9; Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-59; Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15.

E. Factores de transcripción artificiales

[0090] Los factores de transcripción artificiales también pueden utilizarse para regular la expresión del HGF, un HGFR, integrina $\alpha 9$ o estaniocalcina 1. El factor de transcripción artificial se puede diseñar o seleccionar de una biblioteca, p.ej., por su capacidad para unirse a una secuencia en un gen endógeno que codifica el HGF o HGFR, p.ej., en una región reguladora, p.ej., el promotor. Por ejemplo, puede prepararse el factor de transcripción artificial mediante selección *in vitro* (p.ej., empleando la expresión en fagos, patente de EE. UU. núm. 6.534.261) o *in vivo*, o por diseño basado en un código de reconocimiento (véase, p.ej., WO 00/42219 y la patente de EE. UU. núm. 6.511.808). Entre otras cosas, para información sobre métodos para crear bibliotecas de dominios de dedo de zinc variados véase, p.ej., Rebar *et al.* (1996) *Methods Enzymol* 267:129; Greisman y Pabo (1997) *Science* 275:657; Isalan *et al.* (2001) *Nat. Biotechnol* 19:656; y Wu *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 92:344.

[0091] De forma opcional, puede unirse un factor de transcripción adicional a un dominio regulador de la transcripción, p.ej., un dominio de activación para activar la transcripción o a un dominio de represión para controlar la transcripción. En concreto, los dominios de represión pueden utilizarse para disminuir la expresión de genes endógenos que codifican el HGF o HGFR. Por sí mismo el factor de transcripción artificial puede ser codificado por un ácido nucleico heterólogo que se administra a una célula o la propia proteína se puede administrar a una célula (véase, p.ej., la patente de EE. UU. núm. 6.534.261). El ácido nucleico heterólogo que incluye una secuencia que codifica el factor de transcripción artificial puede unirse de modo funcional a un promotor inducible, p.ej., para posibilitar el control exacto del nivel del factor de transcripción artificial en la célula, p.ej., una célula endotelial.

F. Composiciones farmacéuticas

[0092] Un modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o proteína HGFR soluble, p.ej., una región extracelular del HGFR enlazada a un Fc) puede formularse como una composición farmacéutica, p.ej., para la administración a un sujeto para una patología relacionada con el sistema linfático (p.ej., una enfermedad descrita en este documento, como linfedema, filariasis linfática, linfangiomas, linfangiogénesis tumoral o metástasis de tumor). Normalmente, una composición farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos y similares que son fisiológicamente compatibles. La composición puede incluir una sal farmacéuticamente aceptable, p.ej., una sal de adición ácida o un sal de adición de base (véase, p.ej., Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

[0093] El modulador del HGF/HGFR puede formularse de acuerdo con los métodos estándares. La formulación farmacéutica es una técnica establecida y además se describe en, p.ej., Gennaro (ed.), Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association*, 3^a ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

[0094] En un aspecto, el modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o HGFR-Fc) puede formularse con materiales de excipientes, como el cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico heptahidrato, fosfato de sodio monobásico y un estabilizante. Se puede proporcionar, por ejemplo, en una solución tamponada en una concentración adecuada que puede conservarse a 2-8 °C.

[0095] Las composiciones farmacéuticas pueden adquirir diversas formas. Entre estas se incluyen, por ejemplo, líquidas, formas en dosis sólidas y semisólidas, como soluciones líquidas (p.ej., soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La presentación preferida puede depender del modo previsto de administración y de la aplicación terapéutica. Normalmente, las composiciones para los agentes descritos en el presente documento toman forma de soluciones infusibles o inyectables.

[0096] Estas composiciones pueden administrarse de modo parenteral (p.ej., inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular). Las frases "administración parenteral" y "administración de modo parenteral" como se utilizan en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración tópica y enteral, normalmente por inyección e incluyen, sin carácter limitativo, infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

[0097] La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otras estructuras ordenadas adecuadas para el almacenamiento estable en concentración alta. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando un agente descrito en el presente documento en la cantidad necesaria en un solvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como se necesita, seguidas de esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan añadiendo un agente descrito en el presente documento en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables esterilizadas, los métodos preferidos para la preparación son el secado al vacío y liofilización que produce un polvo de un agente descrito en este documento más cualquier ingrediente adicional deseado procedente de una solución previamente filtrada estéril del mismo. La fluidez correcta de una solución puede mantenerse, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento como la lecitina, el mantenimiento del tamaño necesario de las partículas en el caso de dispersión y con el uso de surfactantes. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0098] En determinados aspectos, el modulador del HGF/HGFR puede prepararse con un soporte que protegerá el compuesto ante liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, y sistemas

de administración microencapsulada. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles y biodegradables, como etilvinilacetato, polianhídrido, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoesters y ácido poliláctico. Muchos de los métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son conocidos generalmente. Véase, p.ej., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

[0099] Un modulador del HGF/HGFR puede modificarse (p.ej., un anticuerpo o proteína HGFR soluble), p.ej., con una fracción que mejora su estabilización y/o retención en la circulación, p.ej., en sangre, suero u otros tejidos, p.ej., en al menos 1,5, 2, 5, 10 o 50 veces.

[0100] Por ejemplo, el modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o proteína HGFR soluble) puede asociarse con un polímero, p.ej., un polímero sustancialmente no antigénico, como un óxido de polialquileño o un óxido de polietileno. Los polímeros adecuados variarán básicamente en el peso. Pueden utilizarse los polímeros que tienen un peso medio de número molecular que oscila de aproximadamente 200 a aproximadamente 35.000 Daltons (o aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000 y de 2.000 a aproximadamente 12.500).

[0101] Por ejemplo, un modulador del HGF/HGFR puede conjugarse a un polímero hidrosoluble, p.ej., un polímero hidrófilo polivinilo, p.ej., alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Una lista, sin carácter limitativo a estos polímeros, incluye homopolímeros de óxido de polialquileño como el polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxi-etilenados, copolímeros de los mismos y copolímeros en bloque de los mismos, siempre y cuando se mantenga la hidrosolubilidad de los copolímeros en bloque. Entre los polímeros útiles adicionales se incluyen polioxi-alquilenos, como el polioxi-etileno, el polioxi-propileno y los copolímeros en bloque de polioxi-etileno y polioxi-propileno (Pluronic); los polimetacrilatos; los carbómeros; y los polisacáridos ramificados o no ramificados.

[0102] Cuando se utiliza el modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o proteína HGFR soluble) en combinación con un segundo agente, se pueden formular los dos agentes por separado o juntos. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas respectivas pueden mezclarse, p.ej., justo antes de la administración, y administrarse juntas o pueden administrarse por separado, p.ej., a la vez o en diferentes veces.

[0103] El sistema vascular linfático desempeña un papel crucial en la homeostasis de fluidos tisulares, que afecta y se ve afectado por una serie de patologías entre las que se incluyen, p.ej., metástasis de célula cancerosa; linfedema adquirido, p.ej., inducido por cirugía, radioterapia o infección; enfermedades de la piel, p.ej., epidermólisis causada por el envejecimiento o la exposición excesiva a luz ultravioleta. Además, la metástasis tumoral se produce principalmente a través del sistema linfático y el grado de afectación del ganglio linfático es un factor de pronóstico clave para la gravedad de la enfermedad. Se ha relacionado la linfangiogénesis y la cantidad de vasos linfáticos intratumoral en tumores primarios con la metástasis tumoral en experimentos con animales, por ejemplo, en cáncer de mama. (Skobe *et al.*, *Nature Medicine* 7(2):192-198 (2001)). La vasculatura linfática intratumoral puede desempeñar un papel importante en la metástasis de muchos tipos de tumores como los de mama, colon, pulmón, tiroides, gástrico, cánceres espinocelulares, mesoteliomas, osteosarcomas y neuroblastomas.

G. Administración

[0104] El modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o proteína HGFR soluble) u otro agente pueden administrarse a un sujeto, p.ej., un sujeto humano, mediante una gran variedad de métodos. Para muchas aplicaciones, la vía de administración es infusión o inyección intravenosa (IV), inyección subcutánea (SC), de modo intraperitoneal (IP) o inyección intramuscular. El modulador del HGF/HGFR puede administrarse como una dosis fija o como una dosis ajustada al peso del sujeto (p.ej., una dosis por mg/kg).

[0105] También puede elegirse la dosis para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el modulador del HGF/HGFR.

[0106] La vía y/o modo de administración del también se pueden adaptar para el caso individual, p.ej., mediante el control del sujeto, p.ej., usando imágenes por tomografía, linfangiografía y los parámetros estándares asociados con la enfermedad concreta, p.ej., los criterios para evaluar los trastornos linfáticos o los relacionados con el sistema linfático.

[0107] Las pautas de dosificación se ajuntan para proporcionar la respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o un efecto terapéutico combinatorio. En general, cualquier combinación de dosis (ya sea por separado o coformulada) del modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo) (y opcionalmente un segundo agente) puede utilizarse para proporcionar al sujeto el agente en cantidades biodisponibles. Por ejemplo, se pueden administrar dosis del intervalo comprendido entre 1 mg/kg – 100 mg/kg, 0,5 – 20 mg/kg o 1 – 10 mg/kg.

[0108] El término presentación en dosis unitaria o “dosis fija” como se utiliza en el presente documento hace referencia a unidades físicamente discretas presentadas como dosis unitarias para los sujetos que se han de tratar;

cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en conjunto con el vehículo farmacéutico necesario y, opcionalmente, con el otro agente.

[0109] El modulador del HGF/HGFR puede administrarse al menos una vez entre aproximadamente 10 minutos y 48 horas, más preferentemente entre aproximadamente 10 minutos y 24 horas, más preferentemente en 3 horas, después de la aparición de síntomas o manifestación de una enfermedad linfática o una enfermedad relacionada con el sistema linfático. Por ejemplo, se puede administrar el agente a un paciente que padece o está en riesgo de padecer linfedema. Pueden ordenarse dosis múltiples o únicas. Como alternativa, o además, puede administrarse un agente modulador del HGF/HGFR a través de infusión continua. El tratamiento puede prolongarse durante días, semanas, meses o incluso años con el fin de modular adecuadamente la linfangiogénesis en enfermedades linfáticas o relacionadas con el sistema linfático.

[0110] El modulador del HGF/HGFR puede administrarse una vez por semana durante aproximadamente entre 1 y 10 semanas, preferentemente entre 2 y 8 semanas, más preferentemente entre 3 y 7 semanas, e incluso más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Un experto en la materia apreciará que determinados factores pueden influir en las dosis y tiempo necesarios para tratar de modo eficaz al sujeto, incluyendo, sin carácter limitativo, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, las condiciones de salud generales y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede incluir un tratamiento único o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

[0111] Si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad descrita en el presente documento (p.ej., filariasis) u otra enfermedad relacionada con el sistema linfático, se puede administrar el modulador del HGF/HGFR antes de la aparición de la enfermedad como medida preventiva. La duración de dicho tratamiento preventivo puede ser una dosis unitaria del modulador del HGF/HGFR o el tratamiento puede continuar (p.ej., dosis múltiples), por ejemplo, a un sujeto con riesgo de padecer una enfermedad descrita en el presente documento se le puede tratar con el modulador del HGF/HGFR durante días, semanas, meses o incluso años con tal de prevenir que padezca el daño.

[0112] Una composición farmacéutica puede incluir una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente descrito en el presente documento. Dichas cantidades eficaces se pueden determinar basándose en el efecto del agente administrado, o el efecto combinatorio de agentes si se utiliza más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente también puede variar según los factores como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del sujeto, y la capacidad del compuesto para obtener una respuesta deseada en el individuo, p.ej., mejora de al menos un parámetro de la enfermedad o mejora de al menos un síntoma de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

[0113] Para tratar el cáncer puede utilizarse un antagonista del HGF/HGFR. Los ejemplos de enfermedades cancerosas incluyen, sin carácter limitativo, tumores sólidos, tumores de tejido blando y lesiones metastásicas. Entre los ejemplos de tumores sólidos se incluyen neoplasias, p.ej., sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas de los sistemas de varios órganos, como los que afectan al pulmón, mama, linfoide, gastrointestinal (p.ej., colon) y tracto genitourinario (p.ej., células uroteliales, renales), faringe, próstata, ovario así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias como casi todos los cánceres de colon, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, cáncer del intestino delgado y demás. Las lesiones metastásicas de los cánceres anteriormente mencionados, y en concreto las formas básicamente metastásicas de estos cánceres, también pueden tratarse o prevenirse usando los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

[0114] El método puede utilizarse para tratar neoplasias de los sistemas de varios órganos, como las que afectan al pulmón, mama, linfoide, gastrointestinal (p.ej., colon) y tracto genitourinario, próstata, ovario, faringe, así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias como casi todos los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago. Los tumores sólidos de ejemplo que se pueden tratar incluyen: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma espinocelular, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, cáncer del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

[0115] Los expertos en la técnica reconocen el término “carcinoma”, que hace referencia a neoplasias de tejidos epiteliales o endocrinos, incluyendo carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal,

carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas prostáticos, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. Los carcinomas de ejemplo incluyen los que se forman en tejido de cuello uterino, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, p.ej., que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos sarcomatosos y carcinomatosos. Un “adenocarcinoma” hace referencia a un carcinoma derivado de tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles. Los expertos en la materia reconocen el término “sarcoma” que hace referencia a tumores malignos de origen mesenquimatoso.

H. Dispositivos y kits

[0116] Las composiciones farmacéuticas que incluyen el modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o HGFR soluble) pueden administrarse con un dispositivo médico. El dispositivo se diseña con características como la portabilidad, el almacenamiento a temperatura ambiente y facilidad de uso de modo que pueda utilizarse en situaciones de emergencia, p.ej., por un sujeto sin experiencia o por personal de emergencias en el lugar de los hechos, sin posibilidad de acudir a centros médicos ni utilizar otros equipos médicos. El dispositivo puede incluir, p.ej., uno o más alojamientos para almacenar preparaciones farmacéuticas que incluyen el modulador del HGF/HGFR y que pueden configurarse para administrar una o más dosis unitarias del modulador del HGF/HGFR.

[0117] Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse con un dispositivo para inyección hipodérmica sin aguja, como los dispositivos presentados en las patentes de EE. UU. núms. 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Entre los ejemplos de módulos e implantes reconocidos se incluyen: la patente de EE. UU. núm. 4.487.603, que presenta una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a un ritmo controlado; la patente de EE. UU. núm. 4.486.194, que expone un dispositivo terapéutico para administrar medicación a través de la piel; la patente de EE. UU. núm. 4.447.233, que ofrece una bomba de infusión de medicamento para administrar medicación a una ratio de infusión precisa; la patente de EE. UU. núm. 4.447.224, que presenta un aparato para infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente de EE. UU. núm. 4.439.196, que muestra un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimientos multicámara y la patente de EE. UU. núm. 4.475.196, que presenta un sistema osmótico de administración de fármacos. También se conocen muchos otros dispositivos, implantes, sistemas de administración y módulos.

[0118] En un kit, puede proporcionarse un modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o proteína HGFR soluble). En un aspecto, el kit incluye (a) un recipiente que contiene una composición que incluye un modulador del HGF/HGFR y opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, contener instrucciones, información comercial u otro material que se refiera a los métodos descritos en el presente documento y/o al uso de los agentes para beneficios terapéuticos. En un aspecto, el kit también incluye un primer recipiente que contiene una composición que incluye el modulador del HGF/HGFR, y un segundo recipiente que incluye el segundo agente.

[0119] El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En un aspecto, el material informativo puede incluir información sobre la producción del compuesto, peso molecular del compuesto, concentración, fecha de caducidad, información del sitio de producción y del lote, y demás. En un aspecto, el material informativo hace referencia a los métodos de administración del modulador del HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo o proteína HGFR soluble), p.ej., en una dosis, forma de dosificación o modo de administración adecuados (p.ej., una dosis, forma de dosificación o modo de administración descritos en el presente documento), para tratar un sujeto que ha tenido o tiene el riesgo de padecer una enfermedad linfática o una enfermedad relacionada con el sistema linfático. Puede presentarse la información en una variedad de formatos, entre los que se incluyen el texto impreso, material en soporte magnético, grabación de vídeo o de voz, o como información que proporciona un enlace o dirección al material importante en sí.

[0120] Además del modulador del HGF/HGFR, la composición en el kit puede incluir otros ingredientes, como un solvente o tampón, un estabilizador o un conservante. El modulador del HGF/HGFR puede proporcionarse en cualquier forma, p.ej., en forma líquida, seca o liofilizada, preferentemente sustancialmente pura y/o estéril. Cuando se proporcionan los agentes en una solución líquida, la solución líquida es preferentemente una solución acuosa. Cuando se presentan los agentes como una forma seca, en general se logra la reconstitución mediante la adición de un solvente adecuado. Opcionalmente, puede proporcionarse con el kit el solvente, p.ej., tampón o agua esterilizada.

[0121] El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición o composiciones que contienen los agentes. En algunos aspectos, el kit contiene envases, separadores o recipientes independientes para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede presentarse en una botella, vial o jeringa, y el material informativo en un paquete o funda de plástico. En otros aspectos, los elementos se incluyen en una botella, vial o jeringa que tiene ajunto el material informativo en forma de etiqueta. En algunos aspectos, el kit incluye varios (p.ej., un paquete) recipientes individuales, de los que cada uno contiene una o más formas de dosis unitarias (p.ej., una forma de dosis de las descritas en el presente documento) de los agentes. Los recipientes pueden incluir una dosis unitaria de combinación, p.ej., una unidad que incluye tanto el modulador del HGF/HGFR como el segundo agente,

p.ej., en una ratio deseada. Por ejemplo, el kit incluye varias jeringas, ampollitas, paquetes de láminas, paquetes de ampollas, o dispositivos médicos, p.ej., cada uno contiene una dosis unitaria de combinación única. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos, resistentes al agua (p.ej., impermeables a cambios de humedad o evaporación) y/o opacos.

- 5 **[0122]** Opcionalmente, el kit incluye un dispositivo para la administración de la composición, p.ej., una jeringa u otros dispositivos de administración adecuados. El dispositivo puede proporcionarse ya cargado con uno o ambos agentes, o vacío, pero adecuado para la carga.

III. Métodos de cribado para moduladores de la actividad de la vía del HGF/HGFR

10 **[0123]** El cribado de moduladores putativos de expresión de la vía del HGF/HGFR (p.ej., HGF, HGFR o integrina $\alpha 9$ y estaniocalcina 1) puede llevarse a cabo mediante la determinación del efecto de los moduladores en la actividad del promotor del HGF o HGFR *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, un ácido nucleico que incluye un promotor del HGFR (p.ej., del gen del HGFR de ratón, mono o humano) o región reguladora del mismo, p.ej., Gambarotta *et al.* (1994), *J. Biol. Chem.*, 269(17):12852-12857 o p.ej., un promotor del HGF (p.ej., del gen del HGF de ratón, mono o humano) o región reguladora del mismo, p.ej., Bell *et al.* (1998), *J. Biol. Chem.*, 273(12):6900-6908 puede ser enlazado de modo funcional a un ácido nucleico que codifica un polipéptido reportero, p.ej., uno de los polipéptidos reporteros descritos a continuación (p.ej., proteína verde fluorescente mejorada). Otros promotores que pueden utilizarse incluyen los de otros genes modulados por la actividad de la vía del HGF/HGFR, p.ej., integrina $\alpha 9$ y estaniocalcina 1. El ácido nucleico incluye el promotor diana unido de modo funcional al ácido nucleico reportero puede introducirse en las células en cultivo y/o utilizado para generar un animal transgénico, permitiendo la evaluación de la actividad del promotor *in vivo*. En algunos aspectos, también puede evaluarse un animal transgénico para determinar otros fenotipos (p.ej., inducción o represión de la expresión génica en la piel) afectados por la administración de un modulador del HGF/HGFR.

A. Evaluación de los efectos de los moduladores del HGF/HGFR supuesto en la piel

25 **[0124]** Los métodos presentados en el presente documento permiten evaluar un compuesto para determinar su efecto en la expresión del HGF o HGFR u otro gen diana en un sujeto experimental. En algunos aspectos, el efecto de un compuesto en la piel (p.ej., un compuesto terapéutico para una enfermedad de la piel) puede evaluarse en el mismo sujeto experimental en el que se determina la expresión. El efecto en la piel normalmente se determina como un efecto en la expresión de un gen controlada por un promotor relacionado con el metabolismo de la piel. Entre estos promotores se incluyen aquellos que controlan la expresión y/o síntesis de: un producto que es un componente de la piel, p.ej., la dermis o la epidermis; un producto que afecta a la hidratación o nutrición de la piel; un producto que facilita la síntesis, o degradación, de componentes de la piel; un producto que afecta a la vasculatura de la piel; un producto que afecta al metabolismo de folículos pilosos; un producto que afecta a las estructuras glandulares de la piel; un producto que afecta a la musculatura subcutánea; un producto que afecta al tejido adiposo o un producto que afecta a los nervios cutáneos.

35 **[0125]** Los métodos de la invención son útiles para evaluar un compuesto para determinar un efecto en un parámetro relacionado con la apariencia o salud de la piel, por ejemplo, la elasticidad de la piel, la posibilidad de la piel a arrugarse, la capacidad de la piel para retener líquidos, p.ej., agua o un aceite, la capacidad de la piel para resistir o reparar los daños, p.ej., deterioro producido por la luz o ultravioleta, el metabolismo de los folículos pilosos incluidos la oscilación del crecimiento o deposición de pigmentos, o la función y tomo muscular subcutáneo. En general, los efectos en estos parámetros se evaluarán de modo indirecto, p.ej., por el efecto en la expresión de un gen reportero controlado por un promotor que está normalmente enlazado a un gen que codifica un producto que afecta a cualquiera de estos parámetros.

Animales Transgénicos

45 **[0126]** Entre los animales que pueden utilizarse en los métodos descritos en el presente documento se incluyen mamíferos no humanos, como los cerdos, p.ej., minicerdos; o roedores, p.ej., ratones, ratas o conejillos de indias, p.ej., ratones sin pelo (descritos en, por ejemplo, Begona M. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7717-7721), ratones desnudos, ratones con envejecimiento acelerado (descritos en, por ejemplo, Takeda *et al.* (1991) *L. Am. Geriatr. Soc.* 39:911-19), o ratones mutantes transgénicos que exhiben un fenotipo de envejecimiento acelerado. Una o más células, y preferentemente esencialmente todas, del animal incluyen un transgén. Los animales transgénicos pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para el transgén. El animal sujeto preferido son los ratones.

[0127] Se conocen en la técnica muchos métodos para producir animales transgénicos, p.ej., ratones. A continuación se describe un enfoque de ejemplo.

55 **[0128]** Los procedimientos para la microinyección y manipulación del embrión se describen en, por ejemplo, *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 1986). Los cigotes

de ratón pueden obtenerse de hembras de seis semanas que han sido superovuladas con suero de yegua embarazada (PMS), después de 24 horas seguido de gonadotropina coriónica humana. Las hembras previamente tratadas se dejan con los machos y a la mañana siguiente se comprueba la presencia del tapón vaginal. Las hembras pseudoembarazadas se seleccionan por el estro, se colocan con machos estériles por vasectomía probados y se utilizan como receptores. Se recogen los cigotes y se eliminan las células del cúmulo. Además, se pueden cultivar blastocitos. Los embriones pronucleares se logran de ratones hembra apareadas con machos. Las hembras se tratan con suero de yegua embarazada, PMS, para inducir el crecimiento folicular y con gonadotropina coriónica humana para provocar la ovulación. Los embriones se recuperan en una solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco modificada (DPBS) y se mantienen en el medio esencial de Dulbecco modificado (DMEM) reforzado con 10% de suero fetal bovino.

[0129] La microinyección de un constructo transgénico se puede llevar a cabo empleando micromanipuladores estándares enlazados a un microscopio. Por ejemplo, los embriones se mantienen normalmente en 100 microlitros de gotas de DPBS en aceite mientras se microinyectan. La solución de ADN se microinyecta en el pronúcleo del macho. La inyección con éxito se controla por la inflamación de los pronúcleos. Las células ES recombinantes pueden inyectarse en blastocitos, empleando técnicas similares. Inmediatamente después de la inyección, los embriones se transfieren a las hembras receptoras, p.ej., ratones maduros apareados con ratones machos vasectomizados. En un protocolo general, se anestesia a las hembras receptoras, se realizan escisiones paralumbares para exponer los oviductos, y los embriones se transforman en la región ampular de los oviductos. Se sutura la pared abdominal y se cierra la piel con grapas para heridas.

Cribado para detectar la presencia del constructo dirigido

[0130] Los animales transgénicos se pueden identificar después del nacimiento con protocolos estándares. El ADN procedente de tejido de la cola puede cribarse para detectar la presencia del constructo dirigido empleando transferencia Southern y/o PCR. Las crías que son mosaicos se cruzan después entre ellas si se cree que portan el constructo dirigido en su línea germinal para generar animales transgénicos homocigóticos. Si no está claro si las crías tendrán transmisión de línea germinal, pueden cruzarse con una cepa parental u otra cepa y la cría puede cribarse para la heterocigosis. Éstos se identifican por transferencia de ADN y/o amplificación por PCR del ADN.

[0131] Los heterocigotos se pueden cruzar después entre sí para generar crías transgénicas de homocigotos. Éstos últimos se pueden identificar por transferencia Southern de cantidades equivalente de ADN genómico procedente de ratones que son producto de su cruce, así como ratones que son conocidos heterocigotos y ratones de tipo salvaje. Las sondas para cribar la transferencia Southern puede diseñarse tal y como se indica anteriormente.

[0132] Se conocen otros medios para identificar y caracterizar crías transgénicas. Por ejemplo, la transferencia Northern puede utilizarse para investigar si en el ARNm existe presencia o ausencia de transcritos que codifiquen el gen reportero. Además, se puede utilizar la transferencia western para controlar el nivel de expresión del transgén en varios tejidos de estas crías probando la transferencia western con un anticuerpo contra la proteína codificada por el transgén, o un anticuerpo contra el producto del gen marcador, donde se expresa este gen. Finalmente, en un análisis *in situ* (como inmovilización de las células y etiquetado con anticuerpos) y/o análisis FACS (separación de células activadas por fluorescencia) de varias células procedentes de la cría pueden llevarse a cabo empleando los anticuerpos adecuados para determinar la presencia o ausencia del producto del transgén. Los animales transgénicos pueden generarse para que tengan dos transgenes diferentes con distintos promotores unidos de modo funcional a reporteros detectablemente diferentes, p.ej., por el entrecruzamiento de ratones transgénicos para los transgenes promotor-reportero individuales.

[0133] Pueden utilizarse otros animales transgénicos en los métodos de la invención. Los métodos para la preparación de una variedad de animales se conocen en la técnica. Se puede encontrar un protocolo para la producción de un cerdo transgénico en White y Yannoutsos, *Current Topics in Complement Research: 64th Forum in Immunology*, págs. 88-94; la patente de EE. UU. núm. 5.523.226; la patente de EE. UU. núm. 5.573.933; la solicitud PCT WO93/25071 y la solicitud PCT WO95/04744. Se puede encontrar un protocolo para la producción de una rata transgénica en Bader y Ganten, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Supp. 3:581-587, 1996. Se puede leer sobre un protocolo para la producción de una vaca transgénica en *Transgenic Animal Technology, A Handbook*, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc. Un protocolo para la producción de una oveja transgénica se puede encontrar en *Transgenic Animal Technology, A Handbook*, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc.

Genes reporteros

[0134] La actividad del promotor puede ensayarse mediante el apareamiento de un gen reportero con un promotor de interés (p.ej., el promotor del HGF, HGFR, integrina $\alpha 9$ o estaniocalcina 1). El gen reportero puede ser cualquier gen que codifica un producto detectable, preferentemente uno que puede detectarse con facilidad relativa, p.ej., un producto génico que es fluorescente o que cataliza una reacción que puede determinarse por la formación de un producto luminiscente, fluorescente o coloreado. Por ejemplo, el gen reportero puede codificar una enzima, p.ej., una

enzima que produce un producto detectable, p.ej. un producto coloreado, fluorescente y luminiscente. Los genes reporteros se conocen en la técnica e incluyen un gen de β -galactosidasa, un gen de luciferasa, un gen de proteína verde fluorescente, una proteína cian fluorescente, una proteína amarilla fluorescente, una proteína roja fluorescente, un gen de fosfatasa alcalina, un gen de peroxidasa de rábano, un gen de β -lactamasa o un gen de cloranfenicol acetiltransferasa. Los genes reporteros se describen en, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsh, E. F., y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

IV. Ensayos de diagnóstico

A. Detección de proteínas y ácidos nucleicos

10 **[0135]** Las matrices son herramientas moleculares útiles para caracterizar una muestra, p.ej., una muestra procedente de un sujeto. Por ejemplo, una muestra que tiene sondas de captura para múltiples genes, incluyendo sondas para ácidos nucleicos del HGF, HGFR, integrina $\alpha 9$ y estaniocalcina 1, o para múltiples proteínas. Las matrices pueden tener muchas direcciones, p.ej., sitios localizables en un sustrato. Las matrices mencionadas pueden configurarse en una serie de formatos, a continuación se describen ejemplos de carácter no limitativo.

15 **[0136]** El sustrato puede ser opaco, translúcido o transparente. Las direcciones pueden distribuirse sobre el sustrato en una dimensión, p.ej., una matriz lineal, en dos dimensiones, p.ej., una matriz planar; o en tres dimensiones, p.ej., una matriz tridimensional. El sustrato sólido puede ser de cualquier forma o silueta conveniente, p.ej., cuadrada, rectangular, ovoide o circular.

20 **[0137]** Las matrices se pueden fabricar mediante una serie de métodos, p.ej., métodos fotolitográficos (véase, p.ej., las patentes de EE. UU. núms. 5.143.854, 5.510.270 y 5.527.681), métodos mecánicos (p.ej., métodos de flujo dirigido como se describe en la patente de EE. UU. núm. 5.384.261), métodos basados en salientes poliacrílicos (pins) (p.ej., como se describe en la patente de EE. UU. núm. 5.288.514) y técnicas basadas en microesferas (p.ej., como se describe en la solicitud PCT de EE. UU. 93/04145).

25 **[0138]** La sonda de captura puede ser un ácido nucleico de una sola hebra, un ácido nucleico de doble hebra (p.ej., que se desnaturaliza antes o durante la hibridación), o un ácido nucleico que tiene una región de una sola hebra y una región de doble hebra. Preferentemente, la sonda de captura es de cadena sencilla. La sonda de captura puede seleccionarse por una serie de criterios, y preferiblemente se diseña mediante un programa informático con parámetros de optimización. La sonda de captura puede seleccionarse hibridar con una región rica en secuencia (p.ej., no homopolímera) del gen. La temperatura de fusión, T_m , de una sonda de captura puede optimizarse por
30 selección prudente de la región complementaria y longitud. De modo ideal, la T_m de todas las sondas de captura en la matriz es similar, p.ej., entre 20, 10, 5, 3 o 2 °C de una a otra.

[0139] El ácido nucleico aislado es preferentemente ARNm que puede aislarse con los métodos comunes, p.ej., incluyendo el tratamiento de DNasa para eliminar el ADN genómico y la hibridación a un sustrato sólido enlazado a un oligo-dT (p.ej., como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y). El sustrato
35 se lava y el ARNm se eluye.

[0140] El ARNm aislado puede transcribirse inverso y opcionalmente amplificarse, p.ej., mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), p.ej. como se describe en (la patente de EE. UU. núm. 4.683.202). El ácido nucleico puede ser un producto de la amplificación, p.ej., procedente de la PCR (patentes de EE. UU. núms. 4.683.196 y 4.683.202); amplificación en círculo rodante ("RCA", patente de EE. UU. núm. 5.714.320), amplificación del ARN isothermal o NASBA (patentes de EE. UU. núms. 5.130.238, 5.409.818 y 5.554.517) y amplificación por desplazamiento de hebra (patente de EE. UU. núm. 5.455.166). El ácido nucleico se puede marcar durante la amplificación, p.ej., mediante la incorporación de un nucleótido marcado. Entre los ejemplos de marcadores preferidos se incluyen: etiquetas fluorescentes, p.ej., tinte rojo fluorescente Cy53 (Amersham) o tinte verde fluorescente Cy33 (Amersham), y marcadores quimioluminiscentes, p.ej., como se describe en la patente de EE. UU. núm. 4.277.437. Como alternativa, el ácido nucleico puede marcarse con biotina y detectarse tras la hibridación con estreptavidina marcada, p.ej., estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes).
45

[0141] El ácido nucleico puede contactarse a la matriz. Además, puede contactarse a la misma matriz un ácido nucleico de control o un ácido nucleico de referencia. El ácido nucleico de control o ácido nucleico de referencia puede marcarse con una etiqueta distinta al ácido nucleico de la muestra, p.ej., una con un máximo de emisión diferente. Los ácidos nucleicos marcados pueden contactarse a una matriz en condiciones de hibridación. La matriz puede lavarse y después diagnosticarse por imágenes para detectar la fluorescencia en cada dirección de la matriz.
50

[0142] El nivel de expresión de una proteína HGF o HGFR puede determinarse empleando un anticuerpo específico para el polipéptido (p.ej., empleando ensayo ELISA o transferencia western blot). Además, los niveles de expresión de múltiples proteínas, incluyendo el HGF y HGFR, pueden determinarse rápidamente en paralelo usando una matriz de polipéptido que tengo sondas de captura de anticuerpos para cada uno de los polipéptidos. Los
55

anticuerpos específicos para un polipéptido pueden generarse con un método descrito en el presente documento (véase “Generación de anticuerpos”).

[0143] Se ha desarrollado una matriz de proteínas de baja densidad (formato de 96 pocillos) en la que se identifican las proteínas sobre una membrana de nitrocelulosa (Ge (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, e3, I-VII). Una matriz de alta densidad (p.ej., 100.000 muestras con 222 x 222 mm) utilizada para el cribado de anticuerpos puede producirse mediante la identificación de proteínas en difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Lueking *et al.* (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111). Véase también, p.ej., Mendoza *et al.* (1999). *Biotechniques* 27:778-788; MacBeath y Schreiber (2000) *Science* 289:1760-1763; y De Wildt *et al.* (2000). *Nature Biotech.* 18:989-994. Estos métodos conocidos en la técnica y otros pueden utilizarse para generar una matriz de anticuerpos para detectar la abundancia de polipéptidos en una muestra. La muestra puede marcarse, p.ej., biotinilarse, para la detección posterior con estreptavidina acoplada a un marcador fluorescente. La matriz puede analizarse para medir la unión a cada dirección.

[0144] Las matrices de polipéptidos y ácido nucleicos de la invención pueden utilizarse en un gran número de aplicaciones. Por ejemplo, pueden utilizarse las matrices para analizar una muestra de un paciente. La muestra se compara con los datos obtenidos previamente, p.ej., especímenes clínicos conocidos u otras muestras de pacientes. Además, las matrices pueden utilizarse para caracterizar una muestra de cultivo celular, p.ej., para determinar un estado celular tras la variación de un parámetro, p.ej., la exposición del cultivo celular a un antígeno, un transgén o un compuesto de prueba.

[0145] Los datos de la expresión pueden almacenarse en una base de datos, p.ej., una base de datos relacional como una base de datos SQL (lenguaje de consulta estructurado) (p.ej., entornos de base de datos Oracle o Sybase). Las bases de datos pueden tener múltiples tablas. Por ejemplo, los datos de expresión sin procesar pueden almacenarse en una tabla, en la que cada columna se corresponde con un gen ensayado, p.ej., una dirección o una matriz, y cada fila se corresponde con una muestra. Una tabla distinta puede contener identificadores e información de muestra, p.ej., el número de lote de la matriz utilizada y otra información de control de calidad.

[0146] Los perfiles de expresión obtenidos a partir de un análisis de expresión génica en una matriz pueden utilizarse para comparar muestras y/o células en una serie de estados como se describe en Golub *et al.* ((1999) *Science* 286:531). En un aspecto, la información de expresión (p.ej., expresión del ARNm o expresión de la proteína) para un gen que codifica el HGF y/o un gen que codifica el HGFR se analizan, p.ej., mediante comparación de un valor de referencia, p.ej., un valor de referencia. Los valores de referencia pueden obtenerse de un control, un sujeto de referencia. También pueden obtenerse a partir de análisis estadísticos, p.ej., para proporcionar un valor de referencia para un grupo de sujetos, p.ej., sujeto con la misma edad y género, p.ej., sujetos normales o sujetos que padecen o están en riesgo de padecer una enfermedad linfática o una enfermedad relacionada con el sistema linfático. La similitud estadística con una referencia concreta (p.ej., con una referencia para un grupo asociado con el riesgo) o una cohorte normal pueden utilizarse para proporcionar una evaluación (p.ej., una indicación de riesgo de una enfermedad linfática) a un sujeto, p.ej., un sujeto que no ha padecido enfermedad linfática previa, un sujeto que tiene riesgo de sufrir una enfermedad linfática (p.ej., una predisposición genética) o un sujeto que ha padecido una enfermedad linfática.

[0147] Los sujetos adecuados para el tratamiento también pueden evaluarse para determinar la expresión y/o actividad de la actividad de la vía del HGF/HGFR, p.ej., expresión del HGF, expresión del HGFR, expresión de integrina $\alpha 9$ y expresión de estaniocalcina 1, así como estados de modificaciones u otros parámetros relacionados con estos factores. En algunos aspectos, los sujetos se pueden considerar adecuados para el tratamiento si la expresión y/o actividad para HGF y/o HGFR está alterada (p.ej. elevada) en relación con una referencia, p.ej., el valor de referencia, p.ej., un valor de referencia asociada con la normal.

[0148] Los sujetos a los que se les administra un agente descrito en el presente documento u otro tratamiento para una enfermedad linfática o una relacionada con el sistema linfático puede evaluarse como se describe para la expresión y/o actividad del HGF y/o HGFR. El sujeto puede evaluarse varias veces, p.ej., varias veces durante el transcurso de la terapia, p.ej., durante un régimen terapéutico. El tratamiento del sujeto puede modificarse dependiendo de cómo responde el sujeto a la terapia. Por ejemplo, una reducción en la actividad o expresión del HGFR y/o HGF puede indicar la capacidad de respuesta si el agente que se está administrando es un antagonista.

[0149] Los efectos concretos mediados por un agente pueden mostrar una diferencia (p.ej., en relación con un sujeto no tratado, un sujeto de control u otra referencia) que es estadísticamente significativa (p.ej., valor $P < 0,05$ o $0,02$). La importancia estadística puede determinarse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Entre los ensayos estadísticos de ejemplo se incluyen: prueba t-Student, prueba U de Mann-Whitney no paramétrica, prueba de estadística no paramétrica de Wilcoxon. Algunas relaciones estadísticamente relevantes tienen un valor P inferior a $0,05$ o $0,02$.

B. Métodos para la evaluación de material genético

- 5 [0150] Existen numerosos métodos para evaluar el material genético para proporcionar información genética. Estos métodos pueden utilizarse para evaluar un locus genético que incluye un gen que codifica el HGF o un gen que codifica el HGFR, así como otros locus. Los métodos pueden utilizarse para evaluar uno o más nucleótidos, p.ej., una región codificante o no codificante del gen, p.ej., en una región reguladora (p.ej., un promotor, una región que codifica un intrón o región no traducida, y demás).
- 10 [0151] Las muestras de ácido nucleico pueden analizarse empleando técnicas biofísicas (p.ej., hibridación, electroforesis, etc.), secuenciación, técnicas basadas en enzimas y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, la hibridación de ácidos nucleicos de muestra a micromatrices de ácido nucleico puede utilizarse para evaluar secuencias en una población del ARNm y para evaluar polimorfismos genéticos. Entre las otras técnicas basadas en la hibridación se incluyen unión del cebador específico a las secuencias (p.ej., PCR O LCR); análisis Southern del ADN, p.ej., ADN genómico; análisis Northern del ARN, p.ej., ARNm; técnicas basadas en sondas de fluorescencia (véase, p.ej., Beaudet *et al.* (2001) *Genome Res.* 11(4):600-8); y amplificación específica de alelos. Las técnicas enzimáticas engloban la digestión de enzimas de restricción, secuenciación y extensión de base única (SBE). Los expertos en la técnica conocen estas y otras técnicas.
- 15 [0152] Las técnicas de electroforesis incluyen la electroforesis capilar y detección del polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) (véase, p.ej., Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495-8 y Ganguly (2002) *Hum Mutat.* 19(4):334-42). Otros métodos biofísicos incluyen la desnaturalización mediante cromatografía líquida de alta eficacia (DHPLC).
- 20 [0153] En un aspecto, la tecnología de amplificación específica de alelos que depende de la amplificación por PCR selectiva puede utilizarse para obtener información genética. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden portar la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2437-2448) o en el extremo 3' terminal de un cebador en el que, en condiciones adecuadas, el malapareamiento puede prevenir o reducir la extensión de polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). Además, es posible introducir un sitio de restricción en la región de la mutación para crear detección basada en escisión (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). En otro aspecto, la amplificación puede llevarse a cabo utilizando la Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 88:189). En estos casos, el enlace tendrá lugar sólo si hay un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia 5' haciendo posible la detección de la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de amplificación.
- 25 [0154] Entre los métodos para detectar secuencias se incluyen métodos basados en la amplificación como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Saiki, *et al.* (1985) *Science* 230:1350-1354) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu, *et al.* (1989) *Genomics* 4:560-569; Barringer *et al.* (1990), *Gene* 1989:117-122; F. Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 1988:189-193); los métodos basados en la transcripción utilizan la síntesis de ARN mediante polimerasas del ADN para amplificar ácidos nucleicos (patentes de EE. UU. núms. 6.066.457; 6.132.997; y 5.716.785; Sarkar *et al.*, (1989) *Science* 244:331-34; Stoffler *et al.*, (1988) *Science* 239:491); NASBA (patentes de EE. UU. núms. 5.130.238; 5.409.818 y 5.554.517); amplificación en círculo rodante (RCA, patentes de EE. UU. núms. 5.854.033 y 6.143.495) y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA, patentes de EE. UU. núms. 5.455.166 y 5.624.825). Los métodos de amplificación pueden utilizarse en combinación con otras técnicas.
- 30 [0155] Otras técnica enzimáticas engloban la secuenciación empleando polimerasas, p.ej., polimerasas del ADN y variaciones de la misma así como tecnología basada en la extensión de base sencilla. Véase, p.ej., las patentes de EE. UU. núms. 6.294.336, 6.013.431 y 5.952.174.
- 35 [0156] La detección basada en fluorescencia también puede utilizarse para detectar polimorfismos de ácido nucleico. Por ejemplo, los ddNTP de diferente terminación pueden marcarse con diferentes tintes fluorescentes. Un cebador puede hibridarse próximo o inmediatamente adyacente a un polimorfismo y el nucleótido en el sitio polimórfico puede detectarse por el tipo (p.ej., "color") de tinte de fluorescencia que se ha utilizado.
- 40 [0157] La hibridación a micromatrices también puede utilizarse para detectar polimorfismos, incluidos SNP (polimorfismos de un solo nucleótido). Por ejemplo, una serie de oligonucleótidos diferentes, con el nucleótido polimórfico en posiciones variantes con los oligonucleótidos puede posicionarse sobre una matriz de ácido nucleicos. El grado de hibridación como función de posición e hibridación a oligonucleótidos específicos para el otro alelo puede utilizarse para determinar si está presente un polimorfismo concreto. Véase, p.ej., la patente de EE. UU. núm. 6.066.454.
- 45 [0158] En un modo de realización, las sondas de hibridación pueden incluir uno o más malapareamientos adicionales para desestabilizar la formación doble y sensibilizar el ensayo. El malapareamiento puede ser directamente adyacente a la posición de la secuencia problema, o en 10, 7, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos de la posición de la secuencia problema. Las sondas de hibridación también pueden seleccionarse para tener una T_m concreta, p.ej., entre 45-60 °C, 55-65 °C o 60-75 °C. En un ensayo múltiple, las T_m pueden seleccionarse para estar entre 5, 3 o 2 °C de cada una.
- 50
- 55

[0159] Es posible secuenciar directamente el ácido nucleico para un locus genético concreto, p.ej., mediante amplificación o secuenciación, o amplificación, clonación y secuenciación. Pueden utilizarse dispositivos de secuenciación automática de alto rendimiento (p.ej., basadas en microchip o capilar). Incluso en otros aspectos, la secuencia de una proteína de interés se analiza para comprobar si interfiere en su secuencia genética. Los métodos para analizar una secuencia de proteínas incluyen la secuenciación de proteínas, espectroscopia de masas, inmunoglobulinas específicas de epítipo/secuencia y digestión de proteasa.

[0160] También puede utilizarse cualquier combinación de los métodos anteriores. Dichos métodos pueden utilizarse para evaluar cualquier locus genético, p.ej., en un método para analizar la información genética de grupos concretos de sujetos o en un método para analizar un polimorfismo relacionado con una enfermedad linfática o una enfermedad relacionada con el sistema linfático, p.ej., en un gen que codifica el HGF, HGFR, integrina $\alpha 9$ o estaniocalcina 1.

C. Diagnóstico por imágenes *in vivo*

[0161] Los agentes de unión al HGF/HGFR (p.ej., anticuerpos) pueden utilizarse para detectar la presencia del HGF y/O HGFR *in vivo* (p.ej., diagnóstico por imágenes *in vivo* en un sujeto), respectivamente. El método puede utilizarse para evaluar (p.ej., diagnosticar, localizar o estadiar) una enfermedad descrita en el presente documento, p.ej., una enfermedad linfática o riesgo de padecer dicha enfermedad. El método incluye: (i) la administración a un sujeto (y opcionalmente un sujeto de control) un agente de unión al HGF/HGFR (p.ej., un anticuerpo que se une al HGF o HGFR), en condiciones que permiten la interacción del agente de unión y el HGF o HGFR para que tenga lugar; y (ii) la detección de un agente de unión, por ejemplo, para localizar o, por otro lado, identificar las células que expresan el HGF o HGFR. Un aumento estadísticamente significativo en la cantidad del complejo en el sujeto en relación con la referencia, p.ej., el dato basal del sujeto o sujeto de control, puede ser un factor que puede conllevar un diagnóstico de una enfermedad linfática o una enfermedad relacionada con el sistema linfático o riesgo de padecer dichas enfermedades.

[0162] Preferentemente, el agente de unión al HGF/HGFR utilizado en los métodos de diagnóstico *in vivo* (y también *in vitro*) se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del agente de unión enlazado o no enlazado. Entre las sustancias detectables adecuadas se incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. En un aspecto, la proteína de unión al HGF o HGFR se enlaza a un ión radioactivo, p.ej., indio (^{111}In), yodo (^{131}I o ^{125}I), itrio (^{90}Y), actinio (^{225}Ac), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi), sulfuro (^{35}S), carbono (^{14}C), tritio (^3H), rodio (^{188}Rh), o fósforo (^{32}P). En otro aspecto, la proteína de unión al HGF/HGFR se marca con un agente de contraste NMR.

[0163] En un aspecto, la invención describe un método de diagnóstico por imágenes de la vasculatura (p.ej., la vasculatura linfática) en un paciente que está en riesgo de padecer una enfermedad linfática o una enfermedad relacionada con el sistema linfático, o que está desarrollando la enfermedad. El método incluye: producir un agente que se una a HGF o HGFR, p.ej., un agente descrito en el presente documento, en el que la proteína está físicamente asociada a un agente de diagnóstico por imágenes; administrar el agente a un paciente, p.ej., con riesgo de padecer una enfermedad linfática o una enfermedad asociada con el sistema linfático, y localizar el agente en el paciente, p.ej., mediante imagenología en el paciente, p.ej., para detectar las células que expresan el HGF o HGFR.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. El HGFR se expresa en un nivel más elevado en las células endoteliales linfáticas que en las células endoteliales vasculares de la sangre y es útil

[0164] La RT-PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) confirmó que tres líneas independientemente establecidas de células endoteliales linfáticas (LEC) primarias expresaron niveles altos de ARNm de los marcadores del linaje linfático principal Prox1 y LYVE-1, pero expresaron niveles bajos del marcador de linaje vascular sanguíneo FLT-1, relacionado con las células endoteliales vasculares sanguíneas (BVEC) (Fig. 1A-C). Los niveles de ARNm del HGFR en LEC se midieron mediante QPCR y se comprobó que eran dos veces más altos que los niveles en BVEC (Fig. 1D). Además, los análisis de transferencia western y la inmunoprecipitación demostraron que la expresión de proteína HGFR era más alta en células LEC que en las BVEC (Fig. 1E). Puesto que el tratamiento de las LEC con 30 ng/ml de HGF conllevó la fosforilación aumentada del HGFR (Fig. 1F), el HGFR es útil en las LEC. En resumen, el HGFR se expresa en un nivel más alto en células LEC que en BVEC y se activa cuando se tratan las LEC con el HGF.

Ejemplo 2. La expresión del HGFR se expresa en los vasos linfáticos durante la inflamación y reparación tisular *in vivo*

[0165] Se llevaron a cabo análisis de la inmunofluorescencia diferencial de piel de ratón normal, empleando anticuerpos contra el HGFR y contra el receptor del hialuronato específico para el sistema linfático LYVE-1. Se detectó poca o nula expresión del HGFR en los vasos linfáticos inactivos en piel sana. Con el fin de determinar si el

HGFR podría ser aumentado por el endotelio linfático durante los procesos patológicos, se llevó a cabo la inmunotinción de muestras de piel murina inflamada de carácter crónico obtenidas de reacciones de hipersensibilidad retardada experimentalmente inducida en ratones transgénicos con el VEGF-A (VEGF-TG) que se caracterizan por la proliferación y el aumento de tamaño de los vasos linfáticos, Kunstfeld *et al.* (2004), *Blood*, 104(4):1048-1057. Siete días después de la inducción de la inflamación de la piel, se detectaron vasos linfáticos de LYVE-1 positivo agrandados en los ratones con VEGF-TG pero no en los ratones de tipo salvaje (WT) (Fig. 2A, D). Los vasos linfáticos LYVE-1 positivo expresaron con mayor fuerza el HGFR, mientras que en los vasos linfáticos normales de ratones de tipo salvaje se detectó poca o nula expresión del HGFR (Fig. 2A-F).

[0166] Dos o tres semanas después de la aparición de las heridas de espesor completo experimentalmente inducidas en los ratones, se encontró linfangiogénesis pronunciada en el tejido de granulación. 21 días después de la lesión, varios análisis por inmunofluorescencia del tejido de las heridas revelaron algunos vasos linfáticos LYVE-1 positivo que también expresaron el HGFR (Fig. 2G-L).

[0167] Con el fin de describir el posible papel del HGFR durante la formación de vasos linfáticos embrionarios, se examinaron tejidos embrionarios de ratón en los días embrionarios (E) del 10,5 a 14,5 cuando están en ciernes y tiene lugar la proliferación de los progenitores de vasos linfáticos.

En el E11,5, se detectó la expresión del LYVE-1 en células endoteliales de la vena cardinal anterior. Estas células expresaron poco o nulo HGFR, mientras que la expresión del HGFR ya se había detectado en la región faríngea del intestino proximal y en células mesenquimales (Fig. 3A-C). No obstante, en el día E12,5, la expresión del HGFR era claramente detectable en las células endoteliales positivas LYVE-1 de la vena cardinal anterior (Fig. 3F: puntas de flechas), mientras que sólo se encontró expresión ocasional del HGFR en las células endoteliales que revisten las bolsas linfáticas, superponiéndose con la reactividad de LYVE-1 (Fig. 3D-F). En el día E14,5, se detectó expresión fuerte del HGFR en la mayoría de células endoteliales linfáticas positivas LYVE-1. En este estadio, el HGFR todavía se expresó débilmente por las células endoteliales que revisten la arteria y la vena yugular, que eran LYVE-1 negativo.

Ejemplo 3. El HGF promueve directamente la migración y proliferación de LEC

[0168] El HGF es el único ligando conocido del HGFR y se ha demostrado que induce la proliferación y migración de células endoteliales vasculares humanas (HVEC), p.ej., Bussolino *et al.* (1992), *J. Cell Biol.*, 119:629-641. Con el fin de investigar si los niveles de expresión diferencial del HGFR por LEC frente BVEC podrían conllevar su respuesta diferencial hacia la estimulación del HGF, después investigamos los efectos del HGF en LEC frente a la proliferación de BVEC *in vitro*. El HGF indujo potencialmente a la proliferación de LEC con una concentración mínima eficaz de 1 ng/ml ($p < 0,01$), en comparación con los cultivos de control no tratados. Aunque el HGF también propició la proliferación de BVEC en esta concentración, el grado de estimulación fue mayor en LEC que en BVEC (Fig. 4A). Hasta el momento, el VEGF-C y VEGF-D son los únicos factores que directamente promueven la proliferación de LEC a través de la activación del receptor-3 del VEGF (VEGFR-3), p.ej., Jussila y Alitalo (2002), *Physiol Rev*, 82:673-700, y se ha propuesto que los efectos del FGF-2 en la linfangiogénesis son el resultado del aumento de los ligandos del VEGFR-3 porque podían inhibirse mediante el bloqueo de la vía del VEGFR-3, p.ej., Chang *et al.* (2004), *PNAS*, 101:11658-11663; Kubo *et al.* (2002), *PNAS*, 99:8868-8873. Para investigar si el HGF estimula directa o directamente la proliferación de LEC, después tratamos las LEC con el HGF, en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes contra el VEGFR-3 o HGFR. La incubación de LEC con un anticuerpo bloqueante del HGFR bloqueó potentemente la estimulación de la proliferación de LEC por el HGF ($p < 0,001$), mientras que la incubación con un anticuerpo bloqueante del VEGFR-3, en una dosis que bloqueó de modo eficaz la estimulación del crecimiento por el VEGF-C (datos no mostrados), o con una IgG de control no afectaron a la proliferación inducida del HGF (Fig. 4B). Estos resultados indican que la proliferación de LEC inducida por el HGF tiene lugar independientemente de la activación de la vía VEGF-R3 y depende de la unión eficaz del HGF a su receptor.

[0169] El tratamiento del HGF también promovió dependiente de dosis la migración de LEC y BVEC, con una concentración mínima eficaz de 3 ng/ml (Fig. 4C). Con el fin de investigar si la estimulación del HGF podría también facilitar la formación de canales linfáticos *in vitro*, los cultivos confluentes de LEC se recubrieron con colágeno de tipo I como describieron previamente Hirakawa *et al.* (2003), *Am. J. Pathol.*, 162:575-586. El HGF indujo potentemente la formación del cordón por LEC con una dosis mínima eficaz de 3 ng/ml ($p < 0,001$), en comparación con los cultivos de control no tratados (Fig. 5A, B).

Ejemplo 4. El HGF facilita la formación de vasos linfáticos *in vivo*

[0170] Con tal de investigar si el HGF también podría inducir linfangiogénesis *in vivo*, implantamos Matrigel con o sin HGF por vía subcutánea en ratones FVB como se describe en Hirakawa *et al.* (2003), *Am. J. Pathol.*, 162:575-586. La inmunotinción para la glicoproteína podoplanina específica para el sistema linfático, p.ej., Schacht *et al.* (2003), *EMBO J.*, 22:3546-3556, desveló la formación pronunciada de nuevos vasos linfáticos con Matrigel que contienen el HGF al séptimo día de la implantación, mientras que no se observaron vasos linfáticos en Matrigel de control (Fig. 5A, B).

Ejemplo 5. Bloqueo sistémico del HGFR inhibe el aumento de tamaño de los vasos linfáticos durante la inflamación de la piel experimental

5 [0171] Puesto que descubrimos que los vasos linfáticos aumentados de tamaño expresan con fuerza el HGFR durante la inflamación de la piel experimental en ratones, investigamos después si el HGF podría contribuir directamente al aumento de los vasos linfáticos *in vivo*. Las reacciones de hipersensibilidad retardada se indujeron por la aplicación tópica a las orejas del ratón como se describe en Kunstfeld *et al.* (2004), *Blood*, 104(4):1048-1057. Un día antes de la inducción de la inflamación experimental, se inyectaron 100 µg de un anticuerpo bloqueante contra HGFR o una cantidad igual de inmunoglobulina G de control por vía intraperitoneal. Los análisis por inmunofluorescencia 24 horas después de la inducción de la inflamación mostraron un tamaño significativamente reducido de vasos linfáticos en ratones que han recibido tratamiento con el anticuerpo bloqueante del HGF-R, en comparación con los ratones que han recibido la IgG de control (Fig. 6A, B). Los análisis morfométricos asistidos por ordenador de las secciones con tinción para LYVE-1 y CD31 demostraron que el tamaño medio de los vasos linfáticos, y el porcentaje del área tisular recubierta por los vasos linfáticos, disminuyeron significativamente después de la inyección del anticuerpo bloqueante del HGF-R ($P < 0,01$), en comparación con ratones tratados con IgG de control (Fig. 6C, D). La densidad de los vasos linfáticos no era significativamente diferente entre los dos grupos de tratamiento (Fig. 6E).

Ejemplo 6. El HGF facilita la migración de LEC a través de integrina $\alpha 9$

20 [0172] Con el fin de definir mecanismos moleculares posibles que podrían mediar los efectos del HGF en las LEC, se incubaron dos líneas independientes de LEC con o sin 30 ng/ml HGF durante 6 horas, le siguieron análisis de micromatrices empleando matrices Affymetrix HU133v2™. Comprobamos que estaniocalcina 1 fue uno de los genes altamente aumentados después del tratamiento del HGF. Además, la expresión de la integrina alfa 9 también aumentó significativamente después del tratamiento del HGF. Estos resultados se confirmaron mediante el análisis QPCR (Fig. 7A).

25 [0173] La coincubación de LEC con el HGF en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante de integrina alfa 9 mostró que el bloqueo de la integrina alfa 9 bloqueó parcialmente la migración inducida del HGF ($p = 0,0143$), mientras que la incubación con un anticuerpo bloqueante del HGF-R inhibió completamente el efecto del HGF en la migración de las LEC ($p = 0,0074$) (Fig. 7B).

Ejemplo 7. El HGF facilita la formación de vasos linfáticos *in vivo* independientemente del VEGF

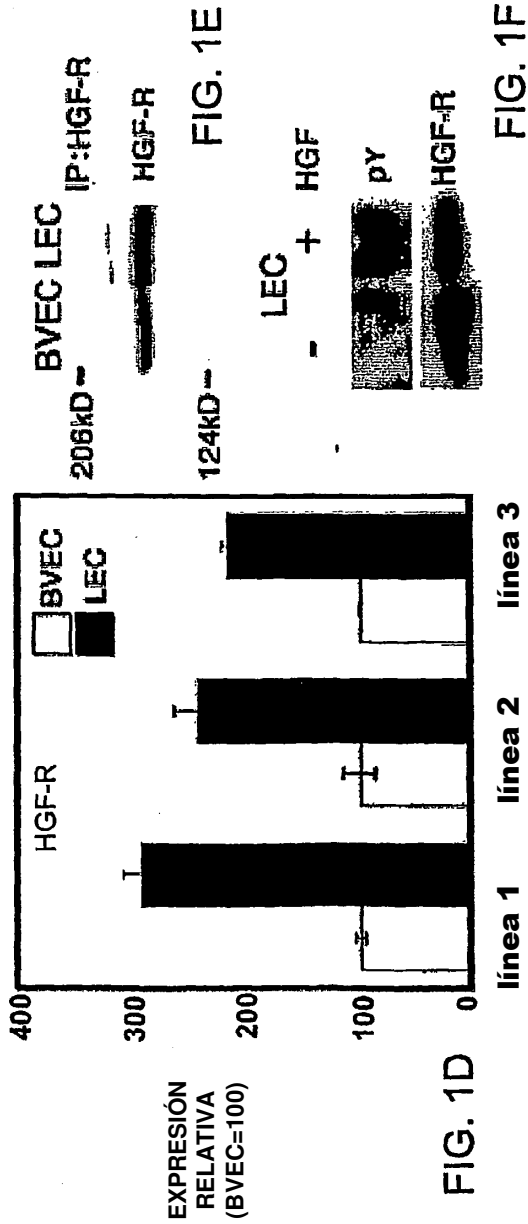
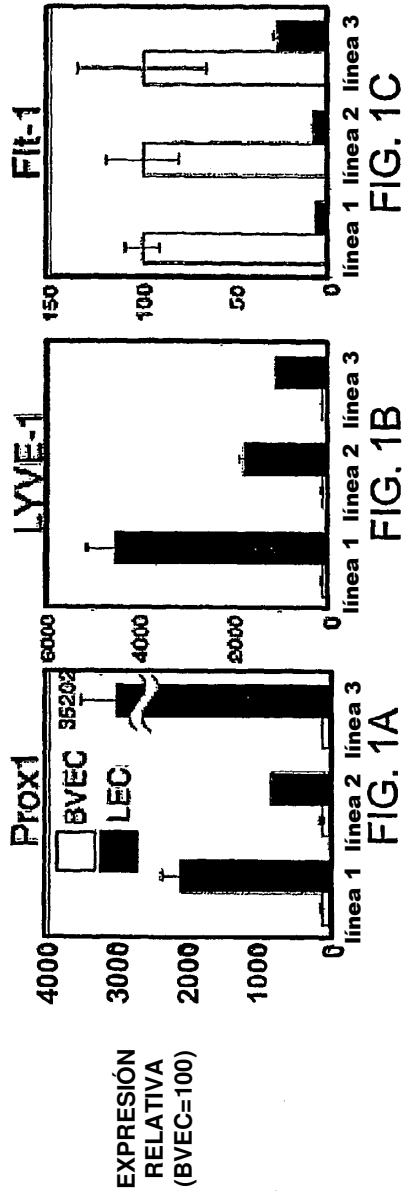
30 [0174] Con el fin de determinar el efecto de la sobreexpresión del HGF *in vivo*, la vasculatura linfática se investigó en ratones transgénicos de HGF dirigido por el promotor I de metalotioneína previamente establecido (Takayama *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 93:5866-5871). El análisis se centró en la piel y en el intestino delgado donde son más abundantes los vasos linfáticos y donde las anomalías del sistema linfático se detectan más rápidamente en los modelos de ratón genético. El aumento de tamaño vascular se detectó en la mucosa y la submucosa del íleon en los ratones transgénicos del HGF (Fig. 8B), en comparación con los ratones de tipo salvaje (Fig. 8A). La tinción por inmunofluorescencia para podoplanina de marcador linfático específica para enfermedades linfáticas también demostró la dilatación pronunciada de los quilíferos centrales y el aumento de los vasos linfático en la submucosa del íleon en los ratones transgénicos con HGF (Fig. 8C, D). La tinción de podoplanina también desveló un número incrementado y un aumento de tamaño de los vasos linfáticos en la piel de ratones transgénicos con el HGF (Fig. 8G, H), pero no se observaron anomalías histológicas mayores (Fig. 8E, F). El aumento y la formación de vasos linfáticos potenciados también se observaron en el duodeno y el hígado de los ratones transgénicos con HGF.

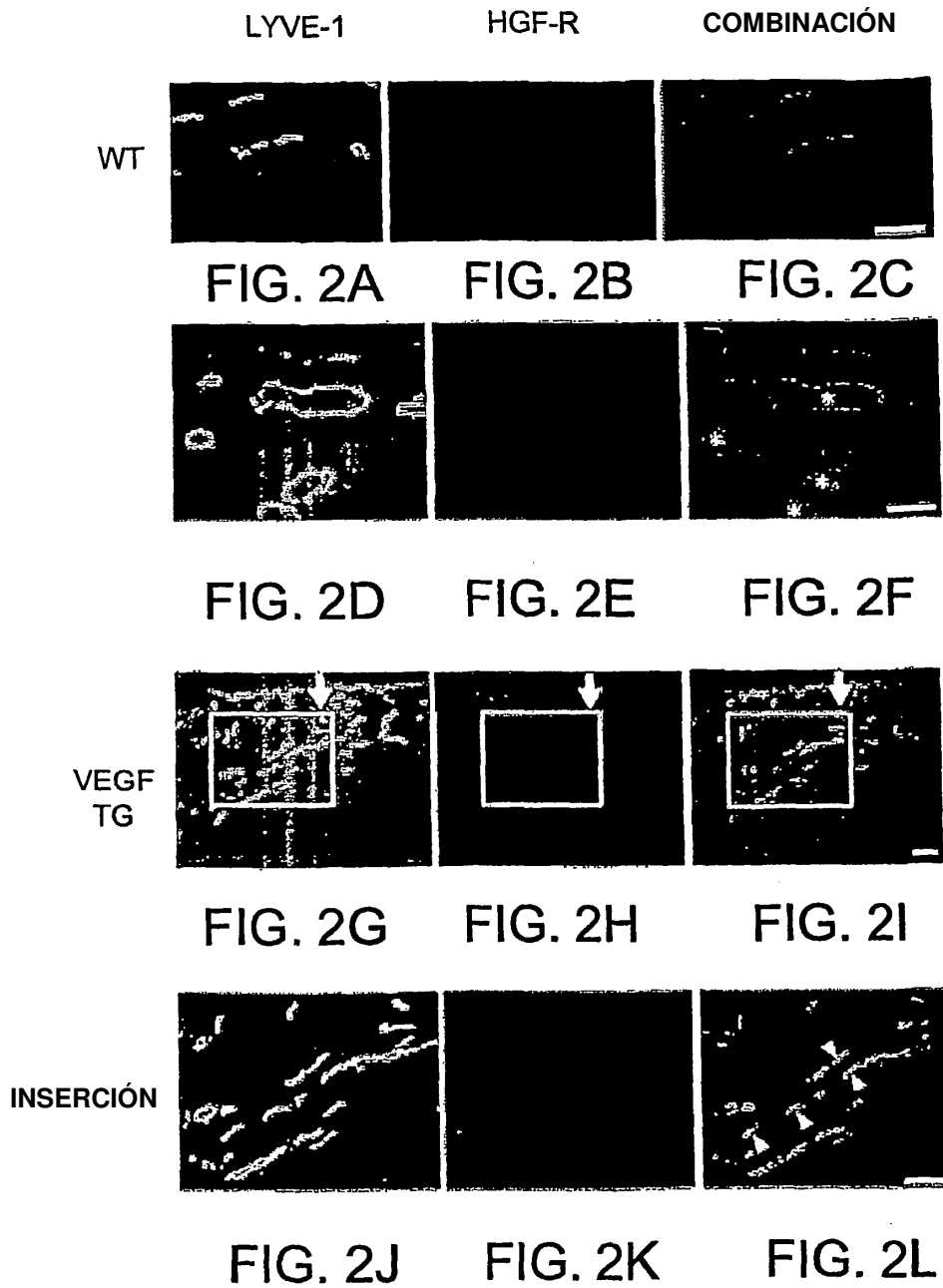
45 [0175] Con el fin de examinar si el HGF facilita la formación de nuevos vasos linfáticos directa o indirectamente a través de la vía VEGFR-3, se implantaron sedimentos de liberación lenta (con o sin HGF) por vía subcutánea en las orejas del ratón y se trataron los ratones de modo sistémico con un anticuerpo bloqueante contra VEGFR-3 de ratón o con IgG de control. Después de 14 días, las tinciones por inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 revelaron la formación de vasos linfáticos pronunciados alrededor de los sedimentos que contienen HGF, pero no entorno a los sedimentos de control (Fig. 9 A-C). No obstante, el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-VEGFR-3 no evitó la formación de vasos linfáticos inducida por el HGF (Fig. 9B, C). Los ratones a los que se les implantaron sedimentos con HGF mostraron formación moderadamente mejorada de vasos sanguíneos.

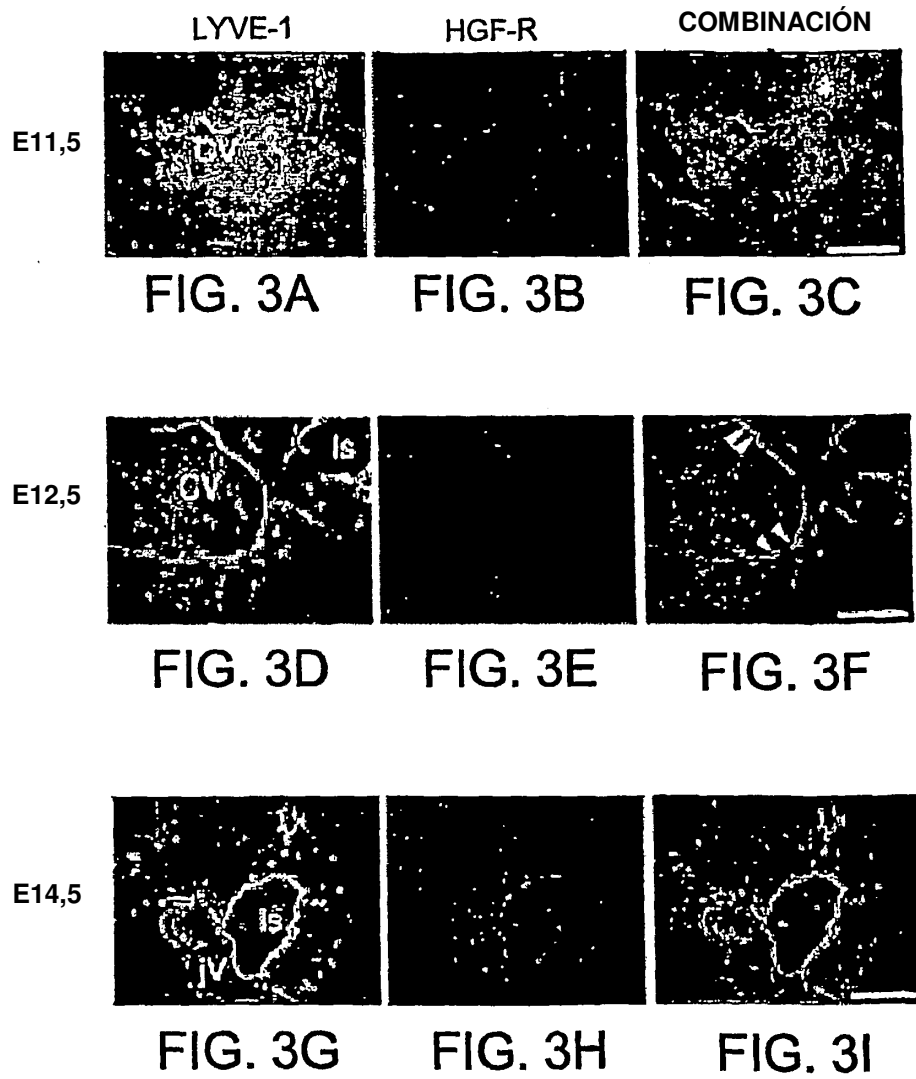
50 [0176] Los resultados de estos ejemplos indican que el HGF es una proteína objetivo para controlar la linfangiogenesis.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) para su uso en el tratamiento del linfedema en un sujeto, donde el agonista se selecciona de un grupo que consta de un polipéptido HGF o un fragmento biológicamente activo del mismo, y un ácido nucleico que codifica un polipéptido HGF o un fragmento biológicamente activo del mismo.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el linfedema se adquiere después de una intervención quirúrgica o radioterapia.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el linfedema está causado por una infección.
- 10 4. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el agonista es un polipéptido HGF formulado para administración subcutánea.
5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el agonista es un polipéptido HGF o un fragmento biológicamente activo del mismo.
- 15 6. La composición para su uso según la reivindicación 5, en la que el polipéptido HGF es un polipéptido HGF humano o el fragmento biológicamente activo de un polipéptido HGF es un fragmento biológicamente activo de un polipéptido HGF humano.
7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el polipéptido HGF humano es un polipéptido HGF humano maduro procesado.
- 20 8. La composición para su uso según la reivindicación 7, en la que el polipéptido HGF humano maduro procesado comprende:
 - una subunidad α que consta de los aminoácidos 55 a 494 de la SEQ ID N^o: 1; y
 - una subunidad β que consta de los aminoácidos 495 a 728 de la SEQ ID N^o: 1;
9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el agonista es un ácido nucleico que codifica un polipéptido HGF o un fragmento biológicamente activo del mismo.
- 25 10. La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el agonista es un ácido nucleico que codifica un HGF humano o un fragmento biológicamente activo del mismo.
11. La composición para su uso según la reivindicación 9, en la que el ácido nucleico codifica un polipéptido que es al menos 90%, al menos 92%, al menos 94%, al menos 96%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idéntico a la SEQ ID N^o: 1.
- 30 12. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-11, en la que el agonista se formula para inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.
13. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-11, en la que el agonista se formula para la administración tópica.
- 35 14. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-13, en la que el agonista se formula como una composición farmacéutica que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-14, en la que el sujeto es un ser humano.







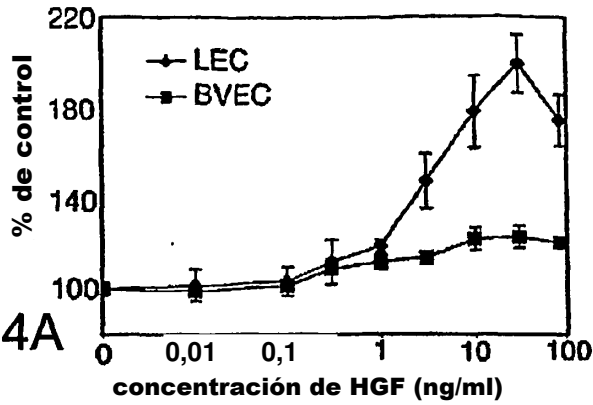


FIG. 4A

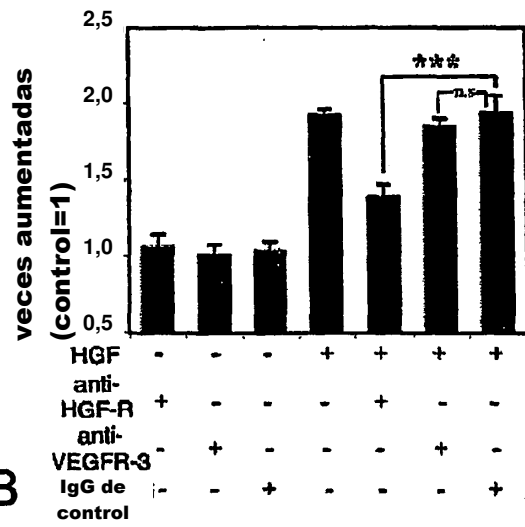


FIG. 4B

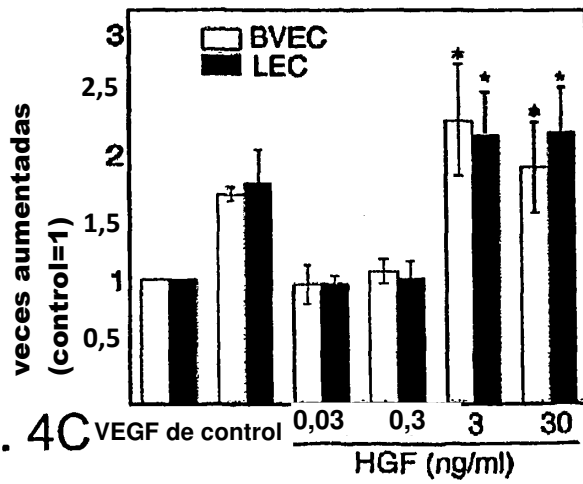


FIG. 4C

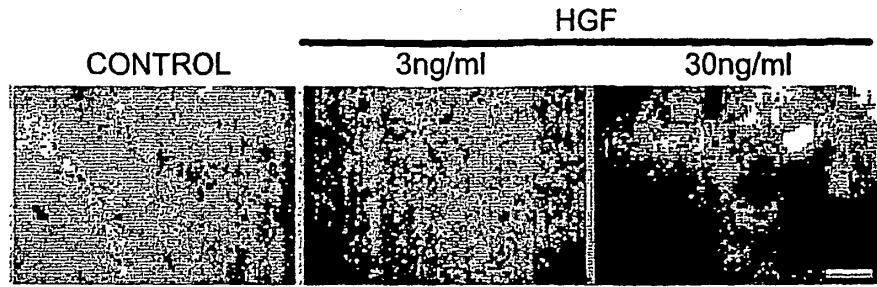


FIG. 5A

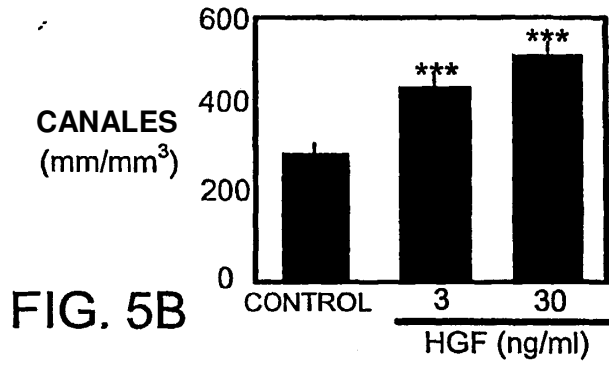


FIG. 5B



FIG. 5C

FIG. 5D

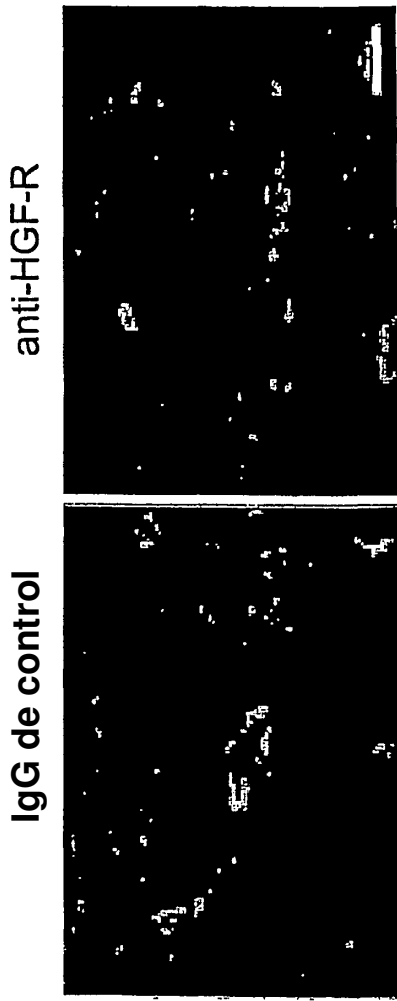


FIG. 6A

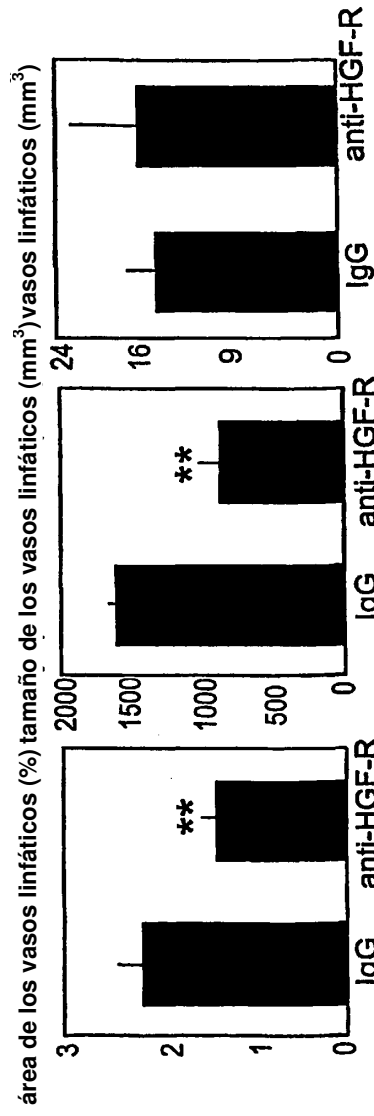


FIG. 6C

FIG. 6D

FIG. 6E

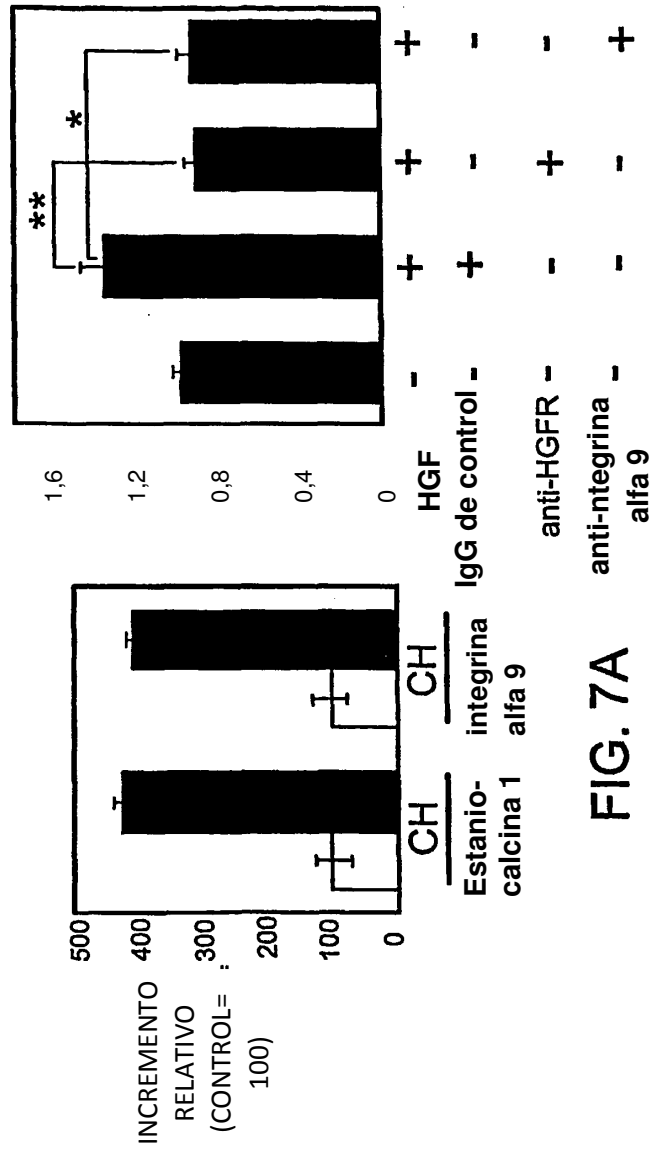
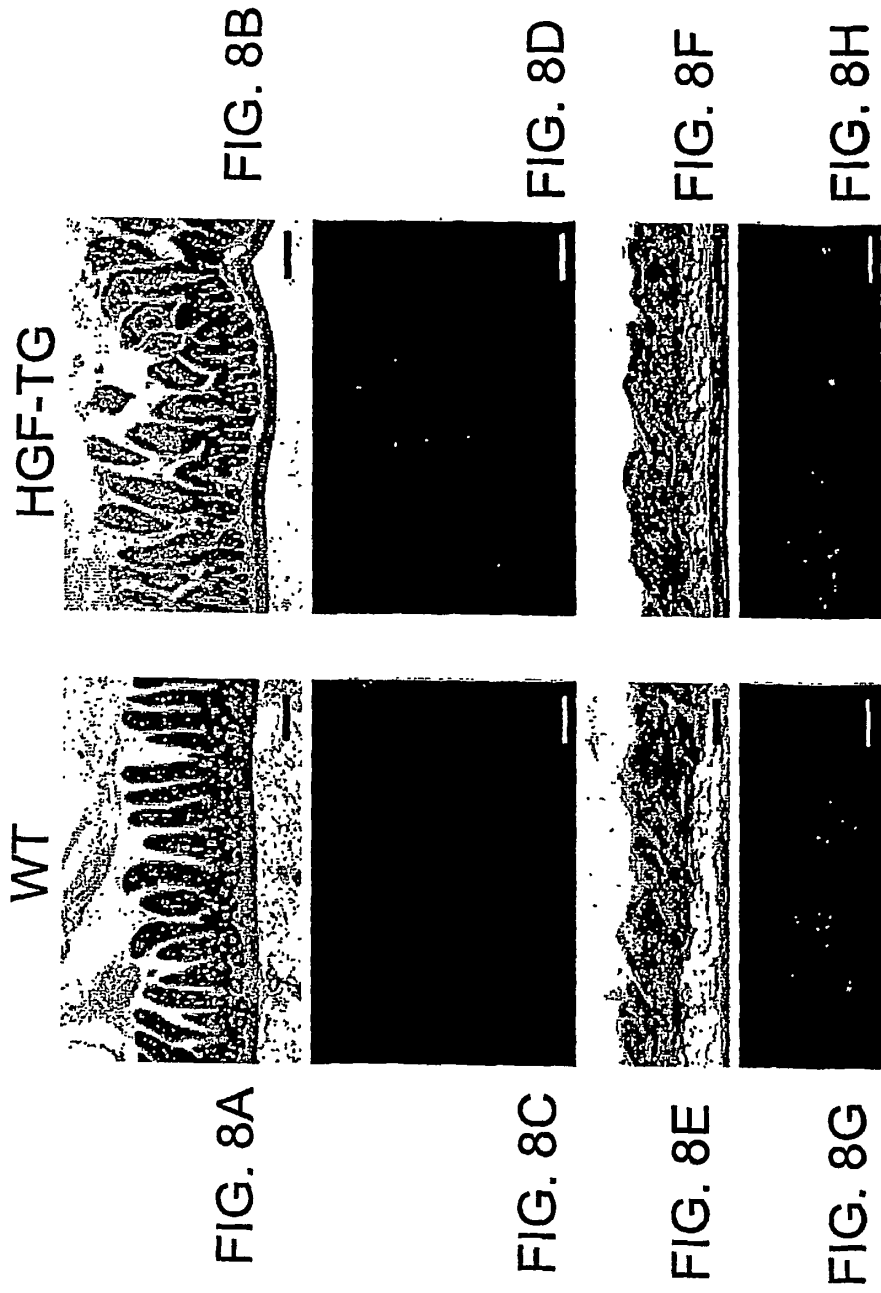


FIG. 7A

FIG. 7B



HGF

control



FIG. 9A

IgG de control



FIG. 9B

anti-VEGFR-3



FIG. 9C