

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 923**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2006 E 06758404 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1869070**

54 Título: **Variantes de cadena beta de HGF**

30 Prioridad:

15.04.2005 US 671610 P

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

10.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIRCHHOFER, DANIEL K.;
LAZARUS, ROBERT A. y
WIESMANN, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 446 923 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

Variantes de cadena beta de HGF

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere generalmente a los campos de la biología molecular y la regulación del factor de crecimiento. Más específicamente, la presente invención se refiere a moduladores de la ruta de señalización de HGF/c-met y a usos de dichos moduladores.

10

ANTECEDENTES

[0002] El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor dispersor (SF), es el ligando para Met (Bottaro et al., 1991), una tirosina quinasa receptora codificada por el protooncogén *c-met* (Cooper et al., 1984a &b). La unión de HGF a Met induce la fosforilación del dominio quinasa intracelular que da como resultado la activación de una compleja serie de rutas intracelulares que conducen al crecimiento, diferenciación y migración celular en diversos tipos de células; varios estudios publicados recientemente proporcionan una exhaustiva visión global (Birchmeier et al., 2003; Trusolino y Comoglio, 2002; Maulik et al., 2002). Además de su importancia fundamental en el desarrollo embrionario y regeneración tisular, la ruta de señalización de HGF/Met también estaba implicada en el crecimiento tumoral invasivo y metástasis y, por tanto, representa una diana terapéutica interesante (Birchmeier et al., 2003; Trusolino y Comoglio, 2002; Danilkovitch-Miagkova y Zbar, 2002; Ma et al., 2003).

[0003] HGF pertenece a la familia de factores de crecimiento relacionados con plasminógeno y comprende una cadena α de 69 kDa que contiene el dominio del dedo N-terminal (N) y cuatro dominios de Kringle (K1-K4), y una cadena β de 34 kDa que tiene una gran similitud con dominios de proteasas de serina proteasas similares a quimotripsina del Clan PA(S)/FamiliaS1 (Nakamura et al., 1989; Donate et al., 1994; Rawlings et al., 2002). Al igual que el plasminógeno y otros zimógenos de serina proteasa, el HGF se secreta en forma precursora de cadena sencilla (scHGF). scHGF se une a proteoglicanos de heparán sulfato, tales como sindecan-1 (Derksen et al., 2002) en superficies celulares o en la matriz extracelular. Los proteoglicanos de heparán sulfato se unen al dominio N (Hartmann et al., 1998), que también contribuye a la unión de Met de alta afinidad junto con aminoácidos situados en K1 (Lokker et al., 1994). Aunque scHGF es capaz de unirse a Met con alta afinidad, no puede activar al receptor (Lokker et al., 1992; Hartmann et al., 1992). La adquisición de la actividad de señalización de HGF depende de la escisión proteolítica (activación) de scHGF en Arg494-Val495 que da como resultado la formación de HGF maduro, un heterodímero $\alpha\beta$ unido mediante puentes disulfuro (Lokker et al., 1992; Hartmann et al., 1992; Naldini et al., 1992). El dominio de tipo proteasa de HGF (cadena β de HGF) está desprovisto de actividad catalítica ya que carece de la triada catalítica requerida Asp [c102]-His [c57]-Ser [c195] (numeración estándar de quimiotripsinógeno en paréntesis) hallada en todas las serina proteasas (Perona y Craik, 1995; Hedstrom, 2002), que tiene una Gln534 [c57] y Tyr673 [c195].

[0004] Debido a su importancia en la regulación de la actividad de HGF, este proceso debe estar controlado estrechamente por enzimas convertidoras de HGF y sus inhibidores fisiológicos correspondientes. La activación de scHGF se mide *in vitro* por serina proteasas similares a quimotripsina, incluyendo el activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA) (Miyazawa et al., 1993), matriptasa/MT-SP1 (Takeuchi et al. 1999; Lin et al., 1999), el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (Naldini et al., 1992), factor XIIa (Shimomura et al., 1995), factor XIa (Peek et al., 2002) y kalikreina plasmática (Peek et al., 2002). Similares a scHGF, estas proteasas se producen en forma de precursores inactivos; sus actividades enzimáticas también están fuertemente reguladas por otras proteasas de activación e inhibidores tanto de tipo Kunitz como de tipo serpina.

[0005] Se han descrito las serina proteasas y su proceso de activación (Donate et al., 1994). En las serina proteasas, la escisión de activación del zimógeno produce una reordenación conformacional del denominado "dominio de activación" dando origen a un punto activo formado adecuadamente y la región de interacción sustrato/inhibidor. El dominio de activación constituye tres bucles expuestos a la superficie llamados bucles [c140], [c180] y [c220] y la inserción del extremo N terminal recién formado en un bolsillo hidrofóbico (Huber y Bode, 1978). En la proteína homóloga estimuladora de macrófagos del par ligando/receptor (MSP)/Ron, la cadena β de MSP similar a serina proteasa proporciona la energía principal para la unión al receptor (Wang et al., 1997; Miller y Leonard, 1998). Esto se invierte a partir del sistema HGF/Met, donde el punto de unión al receptor de alta afinidad para Met está en la cadena α de HGF (Lokker, et al., 1994; Okigaki et al., 1992).

[0006] La importancia del eje de señalización de HGF/Met en la función celular normal y en la etiología de trastornos clínicos sugiere la necesidad de desarrollar medios terapéuticos altamente efectivos basados en la modulación de este eje. La complejidad de esta ruta, sin embargo, particularmente a la luz del mecanismo poco entendido de las interacciones de HGF-HGF y HGF/Met, ha progresado lentamente en este frente y ha destacado la necesidad de desarrollar estrategias que se basen en un mejor entendimiento del mecanismo de acción de las interacciones de HGF-HGF y HGF/Met. La invención descrita aquí a continuación satisface esta necesidad y proporciona otras ventajas.

65

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 **[0007]** El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un factor de crecimiento relacionado con plasminógeno, se une a su Met de tirosina quinasa receptora (también referida en este documento como C-Met, c-Met o c-met), que está implicada en el desarrollo, regeneración tisular y crecimiento tumoral invasivo. La propia cadena β de HGF de tipo serina proteasa se une a Met. A parte de unirse a Met, no está claro qué regiones y residuos específicos en la cadena β de HGF son necesarios para realizar la señalización adecuada a través de la ruta de HGF/Met. Los presentes inventores predijeron que ciertas regiones/posiciones en la cadena β contribuyen de manera importante a una actividad funcional correcta de HGF, donde estas contribuciones pueden implicar o no la unión de la cadena β de HGF a su receptor afin. Los resultados descritos en el presente documento aportan evidencias de que mutaciones en la región N terminal y/o la región de dimerización de la cadena β de HGF pueden alterar la función biológica de HGF/Met, con o sin impedir sustancialmente la unión de HGF (en particular la cadena β de HGF) a c-Met. En general, pero no necesariamente, estas mutaciones no implican posiciones pensadas para comprender el "dominio de activación" o "la región del sitio activo" del HGF de tipo natural.

20 **[0008]** Los análisis de mutación descritos en este documento proporcionan una base para el diseño de una multitud de mutantes de HGF capaces de inhibir las interacciones de HGF/HGF de tipo natural y HGF/c-met en un espectro de potencias. Los ejemplos de dichos mutantes se describen en este documento. Estos mutantes son capaces de competir con HGF de tipo natural por la unión a c-met, aunque muestran una capacidad reducida para realizar las funciones biológicas asociadas a c-met. Esto es particularmente ventajoso cuando la inhibición completa o sustancial del eje HGF/c-met es indeseable; esto es particularmente importante puesto que HGF y c-met se expresan de forma ubicua en células y tejidos normales. Estos mutantes también pueden usarse como agentes terapéuticos ventajosos para tratar afecciones patológicas en las que la actividad biológica reducida, pero no su completa ausencia, de HGF/c-met es deseable. Los métodos y composiciones de la invención se basan, como mínimo en parte, en estos hallazgos que se describen con más detalles a continuación.

30 **[0009]** En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula antagonista de HGF/C-Met que comprende un mutante de HGF que comprende una mutación en la región N terminal de la cadena β de HGF tal como se define en las reivindicaciones.

35 **[0010]** Una mutación en la región N terminal de la cadena β de HGF puede ser cualquiera que impida la inserción del extremo N terminal de la cadena β de HGF en un bolsillo de unión de HGF. En una realización, el mutante de la cadena β de HGF resultante se une a C-Met con una afinidad de unión reducida en comparación con la cadena β de HGF de tipo natural. En una realización, el mutante de la cadena β de HGF resultante se une a C-Met con una afinidad sustancialmente equivalente a la cadena β de HGF de tipo natural. En una realización, el HGF de longitud completa resultante que contiene una cadena β de HGF mutada, se une a C-Met con una afinidad de unión reducida en comparación con el HGF de longitud completa de tipo natural. En una realización, el HGF de longitud completa resultante que contiene una cadena β de HGF mutada se une a C-Met con una afinidad sustancialmente equivalente al HGF de longitud completa de tipo natural. En una realización, una mutación se encuentra en o adyacente a la posición P1' (es decir, 495 [c16]), en la que la mutación da lugar a un mutante de HGF escindible, y en la que el extremo N terminal de la cadena β de HGF no se inserta en el sitio activo/bolsillo de unión. Ejemplos para la incapacidad de insertarse en el sitio activo/bolsillo de unión incluyen, pero sin limitación, configuraciones en las que el mutante es defectuoso en alguno o ambos de (i) interacciones hidrofóbicas, y (ii) formación de puentes de sales que implican el extremo N-terminal a Asp672 [c] 194, por ejemplo, donde un extremo N terminal contiene una mutación, por ejemplo, un residuo de aminoácido sustituido o insertado cargado positivamente. En una realización, la señalización a través de este mutante está impedida. En una realización, una mutación se encuentra en o adyacente a una o más de las posiciones P1', P2', P3' y P4'.

50 **[0011]** También se describe en el presente documento una mutación en el dominio de dimerización de la cadena β de HGF que puede ser cualquiera que se espera que impida el contacto entre dos cadenas β de HGF, de manera que se impida la dimerización de las dos cadenas (y de este modo, dos moléculas de HGF). Dichas mutaciones serían evidentes a partir de la estructura de aminoácidos de complejos de HGF, por ejemplo, tal como se describe en Kirchofer et al., J Biol Chem. (2004), 279(38):39915-24. Las posiciones de aminoácidos relevantes incluyen, pero sin limitación, las descritas en el presente documento. En un ejemplo, el mutante de HGF resultante ha reducido la capacidad de dimerizarse con otra cadena β de HGF. En un ejemplo, una mutación en la región de dimerización de la cadena β de HGF no impide sustancialmente la unión del mutante de HGF resultante a C-Met.

60 **[0012]** El dominio de dimerización se refiere a una región de una cadena β de HGF que interacciona con otra cadena β de HGF para formar un dímero (por ejemplo, en un complejo de activación de HGF/Met). Tras la escisión de proHGF, la cadena β de HGF experimenta un cambio conformaciones. El residuo 495 N-terminal de la cadena β de HGF forma un puente de sal con el residuo Asp 672. En algunos ejemplos, la región de dimerización de una cadena β de HGF comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, por lo menos un residuo de aminoácido (hasta todos los residuos de aminoácidos) correspondientes a los residuos de la cadena β de HGF de aproximadamente 495 a 502, incluyendo los aminoácidos [bucle c140] Y619, T620, G621, incluyendo los aminoácidos del bucle [c180] 662 a 665, o mezclas de los mismos. En un ejemplo, el dominio de dimerización

incluye posiciones localizadas próximas/adyacentes a una o más de las posiciones indicadas anteriormente y, de este modo, se predice que influyen a dicha una o más posiciones. Por ejemplo, en este ejemplo, el dominio de dimerización puede incluir además las posiciones 622 y 626.

5 **[0013]** En un aspecto, una molécula antagonista de HGF/Met de la invención comprende una mutación en la región N terminal de la cadena β de HGF, en la que la mutación está en la posición V495, G498, R502 más T503, y/o D672, tal como se define en las reivindicaciones. Una mutación puede estar en cualquier forma que altere la estructura primaria, secundaria y/o terciaria de la región N terminal de la cadena β de HGF. Por ejemplo, en una realización, una mutación en la región N terminal de la cadena β de HGF es una sustitución, inserción y/o delección, tal como
10 V495G, V495A, G498I, G498P, G498V, R502del más T503del, o D672N. En otra realización, una mutación en la región N terminal de la cadena β de HGF es una delección de V495. Una mutación que altera la estructura primaria, secundaria y/o terciaria de la región N terminal de la cadena β de HGF también puede ser una posición de aminoácido que no esté en la propia región N terminal de la cadena β de HGF. Por ejemplo, una mutación de D672 que elimina la formación de puentes de sales (por ejemplo, D672N) con la región N terminal de la cadena β de HGF,
15 también se esperaría que altere la estructura primaria, secundaria y/o terciaria de la región N terminal de la cadena β de HGF. De este modo, las mutaciones de la región N terminal de la cadena β de HGF y la región de dimerización de la cadena β de HGF necesariamente no se excluyen mutuamente. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, y se ejemplifica en la figura 1, se puede esperar que una mutación en ciertas posiciones afecte a los dominios N terminales y de dimerización de la cadena β de HGF.

20 **[0014]** Una molécula antagonista de HGF/Met puede comprender una mutación en el dominio de dimerización de la cadena β de HGF, en la que la mutación es en la posición N497, G498, P500, en o adyacente a T501 y R502, o R502. Una mutación puede estar en cualquier forma que altere la estructura primaria, secundaria y/o terciaria de la región de dimerización de la cadena β de HGF. Los ejemplos de mutaciones que alterarían la estructura de la región de dimerización de la cadena β de HGF incluyen mutaciones que introducen un residuo que está cargado o tiene una cadena lateral grande (por ejemplo, voluminosa) en la secuencia de tipo natural, mediante lo cual un residuo cargado puede dar lugar a interacciones de repulsión y una cadena lateral grande puede dar lugar a interacciones estéricas adversas. Además, también se pueden introducir mutaciones de cisteína (por ejemplo, L622C, I664C, P500C, y N497C) que están disponibles para la modificación mediante reactivos alquilantes de tiol, tales como los grupos que contienen maleimida y haloacetilo. En un ejemplo, una mutación en la región de dimerización de la cadena β de HGF es una sustitución, inserción y/o delección, tal como N497R o K; G498A o S; P500W, H o E; inserción entre T501 y R502 (por ejemplo, una inserción de R y/o S); o R502del. En un ejemplo, una mutación en la posición N497 no es N497F, A o E. En un ejemplo, una mutación está en una o más de las posiciones 495 a 503, en la que dicha mutación podría alterar la dimerización de la cadena β de HGF y/o la unión al receptor. En otro ejemplo, las mutaciones que afectan al dominio de dimerización se pueden combinar con una mutación en una o más posiciones fuera del dominio de dimerización, por ejemplo, una mutación en o adyacente al sitio de separación 494-495. Por ejemplo, en un mutante que se esperaría no separable (por ejemplo, el doble mutante R494E:V495G) y que también contiene una mutación en el dominio de dimerización, dicho mutante mostraría sin embargo una función biológica impedida incluso si se separa in vivo.

40 **[0015]** En algunas realizaciones de una molécula antagonista de HGF/Met de la invención, la molécula comprende aminoácidos de tipo natural en la posición 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699, y/o 702. En algunos ejemplos de antagonistas de HGF/Met, los antagonistas comprenden mutaciones en la posición L622 (por ejemplo, L622C o K); 1623 (por ejemplo, I623C); D626 (por ejemplo, D626K); L622 más D626 (por ejemplo, L622K más D626K); K663 (por ejemplo, K663C); I664 (por ejemplo, I664C); R502 (por ejemplo, 502C); P500 (por ejemplo, P500C); N497 (por ejemplo, N497C); R494 más I623 (por ejemplo, R494E más I623C); N497 más G498 (por ejemplo, N497R más G498A, o N497K más G498A); N497 más P500 (por ejemplo, N497R más P500H, o N497K más P500H); G498 más P500 (por ejemplo, G498A más P500H); N497 más G498 más P500 (por ejemplo, N497R más G498A más P500H, o N497K más G498A más P500H); N497 más L622 (por ejemplo, N497R más L622K, o N497K más L622K); N497 más D626 (por ejemplo, N497R más D626K, o N497K más D626K); N497 más L622 más D626 (por ejemplo, N497R más L622K más D626K, o N497K más L622K más D626K).

55 **[0016]** En un ejemplo, una molécula antagonista de HGF/Met comprende una mutación en el sitio activo de HGF solo o en combinación con una o más de las mutaciones descritas en el presente documento. Las mutaciones del sitio activo incluyen mutaciones en la posición 667 y/o 704. Las mutaciones adecuadas incluyen la sustitución de una o ambas de estas posiciones con una C o un W.

60 **[0017]** En general, una molécula antagonista de HGF/Met de la invención comprende una molécula de HFG que tiene una mutación en la cadena β de HGF que reduce una o más de las características biológicas asociadas normalmente con HGF de tipo natural. Por ejemplo, en una realización, la molécula ha reducido la capacidad de señalización de C-Met (por ejemplo, fosforilación de Met) en comparación con HGF de tipo natural. En otra realización, la molécula ha reducido la capacidad de estimular la migración celular en comparación con la HGF de tipo natural. En otra realización, la molécula ha reducido la capacidad de estimular la proliferación celular en comparación con HGF de tipo natural. En otra realización, la molécula ha reducido la capacidad de estimular la angiogénesis en comparación con HGF de tipo natural. Una molécula antagonista de HGF/Met de la invención
65

comprende en general por lo menos una parte del HGF una cadena que está implicada en la unión a Met, unida a una cadena β de HGF mutada tal como se describe aquí.

- 5 [0018] Tal como se muestra mediante el análisis mutacional aquí descrito, ciertas regiones y posiciones de aminoácido específicas en las mismas, en la cadena β de HGF juegan papeles importantes en la modulación de funciones biológicas de HGF. Por consiguiente, en el presente documento se describen moduladores de HGF/Met que reconocen específicamente estas regiones. Dichos moduladores incluyen ácidos nucleicos, tales como aptámeros y polipéptidos, tales como péptidos de unión y anticuerpos.
- 10 [0019] Tal como se utiliza aquí, la letra antes de un número indica el correspondiente aminoácido de tipo natural hallado en la posición de aminoácido indicado por ese número en un polipéptido de HGF humano de tipo natural, y la letra o letras (si están presentes) después del número indica el tipo de mutación/aminoácido (por ejemplo, aminoácido de sustitución, delección (del) o inserción (ins)).
- 15 [0020] En un aspecto, la presente invención proporciona un mutante de HGF que tiene actividad moduladora de HGF/c-met, por ejemplo un antagonista de actividad de HGF/c-met o una variante de HGF que muestra una reducción, pero no una ausencia, de actividad biológica de HGF (por ejemplo, actividad estimuladora de crecimiento celular). En una realización, un antagonista de la invención es capaz de inhibir la actividad biológica de HGF de tipo natural in vivo o in vitro (dicha actividad biológica incluye, pero sin limitación, la fosforilación del receptor, la estimulación de la proliferación celular, el aumento de la supervivencia celular, la promoción de la angiogénesis, la inducción/promoción de la migración celular). En una realización, un mutante de HGF proporciona una actividad de promoción del crecimiento celular reducida (por ejemplo, proliferación celular, supervivencia celular, migración celular, angiogénesis).
- 25 [0021] Una molécula antagonista puede competir con HGF de tipo natural para la unión a Met. En algunos ejemplos, dicha molécula inhibe la multimerización (por ejemplo, dimerización) del receptor c-met. En algunos ejemplos, dicha molécula comprende una variante (mutante) de cadena β que tiene una capacidad reducida de interaccionar (por ejemplo, multimerizar/dimerizar) con otra molécula de cadena β . En algunos ejemplos, dicha molécula inhibe la multimerización (por ejemplo, dimerización) de la cadena β de HGF. En algunas realizaciones, dicha molécula se une a c-Met, pero exhibe una capacidad reducida para efectuar la activación de c-met (por ejemplo, tal como se indica por la reducción de la fosforilación de c-met, fosforilación de proteína quinasa (MAPK) activada por mitógeno, y/o una reducción en la migración celular, proliferación celular, supervivencia celular, morfogénesis celular, angiogénesis, etc, dependiente de HGF/c-met).
- 30 [0022] En cualquier molécula de la invención en la que se mutan una o más posiciones en relación con la secuencia homóloga de tipo natural, la mutación puede ser de cualquier forma que altere el efecto funcional del correspondiente residuo de tipo natural tal como se define en las reivindicaciones. Se puede obtener una mutación en cualquier forma adecuada conocida en la técnica (y/o determinada empíricamente), por ejemplo mediante sustitución, inserción, adición y/o delección. En algunas realizaciones, una mutación comprende una sustitución no conservativa. Las sustituciones adecuadas incluyen, pero sin limitación, las descritas en este documento (en particular en los ejemplos), por ejemplo, con aminoácidos, tales como alanina y serina.
- 35 [0023] En un aspecto, una molécula/sustancia (por ejemplo, moduladores de HGF/c-met tal como se describen en el presente documento) se une a una toxina, tal como un agente citotóxico. Estas moléculas/sustancias se pueden formular o administrar en combinación con un aditivo/agente potenciador, tal como radiación y/o un agente quimioterapéutico.
- 40 [0024] La presente invención también proporciona métodos y composiciones útiles para modular estados patológicos asociados con la desregulación del eje de señalización de HGF/c-met. De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona una molécula antagonista de HGF/c-met de la presente invención para utilizar en un método de reducción de la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una molécula antagonista de HGF/c-met de la presente invención, mediante lo cual se reduce la activación de c-met. En una realización, dicha molécula es un antagonista de HGF/c-met que inhibe la actividad de HGF/c-met. En una realización, dicho antagonista inhibe la unión de la cadena β e HGF de tipo natural a c-met. En un aspecto, la invención proporciona una molécula antagonista de HGF/c-met de la invención para utilizar en un método de tratamiento de una afección patológica asociada con la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto un antagonista de c-met de la invención, mediante lo cual se inhibe la activación de c-met.
- 50 [0025] La ruta de señalización de HGF/c-met está implicada en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, que incluyen, por ejemplo, la estimulación del crecimiento celular (por ejemplo, la proliferación celular, la supervivencia celular, la migración celular, la morfogénesis celular) y la angiogénesis. De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona un método de inhibición del crecimiento celular (por ejemplo, proliferación y/o supervivencia) activado por c-met, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula o tejido con un antagonista de la invención, mediante lo cual se inhibe la proliferación celular asociada con la activación de c-met. En otro aspecto, la invención proporciona un método de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho método administrar a una
- 60
- 65

célula, a un tejido y/o a un sujeto con una afección asociada con una angiogénesis anormal un antagonista de HGF/Met de la invención, mediante lo cual se inhibe la angiogénesis.

[0026] Se puede utilizar un antagonista de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis. El antagonista puede estar en cualquier forma descrita en el presente documento, incluyendo anticuerpo, fragmento de anticuerpo, polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido, mutante/variante del polipéptido HGF), ácido nucleico (aptámero) o combinación de los mismos.

[0027] Se puede utilizar un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0028] Se puede utilizar un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0029] Se puede utilizar una célula huésped de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0030] Se puede utilizar un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0031] En el presente documento se describe un kit utilizado en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmune (tal como autoinmune) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0032] También se describen en el presente documento:

un método de inhibición de la proliferación celular activada por c-met, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula o tejido con una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, mediante el cual se inhibe la proliferación celular asociada con la activación de c-met;

un método de tratamiento de una afección patológica asociada con la desregulación de la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, mediante el cual se trata dicha afección;

un método de inhibición del crecimiento de una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un antagonista de c-met de la invención, provocando así la inhibición del crecimiento de dicha célula, en el que la célula puede entrar en contacto con el HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, a través de un efecto paracrino);

un método de tratamiento terapéutico de un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, tratando así de manera eficaz dicho mamífero, en el que la célula puede entrar en contacto con el HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, a través de un efecto paracrino);

un método para el tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo celular asociado con una expresión o actividad incrementada de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto con necesidad de dicho tratamiento una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, tratando o previniendo así de manera eficaz dicho trastorno proliferativo celular, en el que dicho trastorno proliferativo puede ser cáncer;

un método de inhibición del crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es, por lo menos en parte, dependiente del efecto potenciador del crecimiento de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula, en el que la célula puede entrar en contacto con el HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, a través de un efecto paracrino); y

un método de tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es, por lo menos en parte, dependiente del efecto potenciador del crecimiento de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, tratando así de manera eficaz dicho tumor, en el que la célula puede entrar en contacto con el HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, a través de un efecto paracrino).

[0033] Los métodos descritos en este documento se pueden utilizar para afectar a cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados con la desregulación de la ruta de señalización de HGF/c-met. En un ejemplo, una célula que es una diana en un método de la presente invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de

mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de carcinoma papilar (por ejemplo, de la glándula tiroides), una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cuello de útero, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma, una célula de mieloma múltiple, y una célula de leucemia. En un ejemplo, una célula que es una diana en un método de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En un ejemplo, una célula que es una diana en un método de la invención es una célula displásica. En aún otro ejemplo, una célula que es una diana en un método de la invención es una célula metastásica.

[0034] Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en un ejemplo, un método comprende además una etapa en la que una célula y/o tejido diana (por ejemplo, una célula cancerosa) está expuesta a tratamiento por radiación o un agente quimioterapéutico. En un ejemplo, una molécula antagonista de HGF/Met de la invención se administra a un sujeto en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo erlotinib (TARCEVA®), pemetrexed (ALIMTA®), bevacizumab (AVASTIN®), gefitinib (IRESSA®), trastuzumab (HERCEPTIN®), y rituximab (RITUXAN®). La administración de agentes terapéuticos en terapia de combinación puede tener lugar de manera simultánea o secuencial.

[0035] Tal como se describe en el presente documento, la activación de c-met es un proceso biológico importante, la desregulación del cual conduce a numerosas afecciones patológicas. Por consiguiente, en un ejemplo de métodos descritos en el presente documento, una célula que es una diana (por ejemplo, una célula cancerosa) es aquella en que aumenta la activación de c-met en comparación con una célula normal del mismo origen tisular. En un ejemplo, un método de la invención provoca la muerte de una célula diana. Por ejemplo, el contacto con un antagonista de la invención puede dar lugar a la incapacidad de las células para señalar a través de la ruta de c-met, lo cual da lugar a la muerte celular.

[0036] La desregulación de la activación de c-met (y de este modo la señalización) puede resultar de una serie de cambios celulares, incluyendo, por ejemplo, la sobreexpresión de HGF (un ligando afín de c-met) y/o el propio c-met. Por consiguiente, en algunos ejemplos, un método descrito en el presente documento comprende reconocer una célula en la que c-met o el factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, se expresan de manera abundante por dicha célula (por ejemplo, una célula cancerosa) en comparación con una célula normal del mismo origen de tejido. Una célula que expresa c-met se puede regular por HGF de una variedad de fuentes, es decir, de una manera autocrina o paracrina. Por ejemplo, en un ejemplo de métodos descritos en este documento, una célula diana entra en contacto/se une a un factor de crecimiento de hepatocitos expresado en una célula diferente (por ejemplo, a través de un efecto paracrino). Dicha célula diferente puede ser del mismo o diferente origen de tejido. En un ejemplo, una célula diana entra en contacto/se une a un HGF expresado por la propia célula diana (por ejemplo, a través de un efecto/bucle autocrino).

[0037] En algunos ejemplos, los antagonistas de HGF/Met de la invención comprenden mutantes de HGF que comprenden modificaciones que aumentan su efecto inhibitorio y/o terapéutico (incluyendo, por ejemplo, una afinidad aumentada, propiedades farmacocinéticas mejoradas (tales como la semivida, estabilidad, velocidad de eliminación), toxicidad reducida para el sujeto). Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones que implican glicosilación, pegilación, sustitución con aminoácidos no naturales, pero funcionalmente equivalentes, grupos de enlace, etc. Las modificaciones adecuadas son conocidas en el sector y se pueden determinar adicionalmente de forma empírica según sea necesario.

[0038] En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden uno o más antagonistas de HGF/c-met de la presente invención y un portador. En una realización, el portador es farmacéuticamente aceptable.

[0039] En un aspecto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un antagonista de HGF/c-met de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. En una realización, un ácido nucleico de la invención codifica un antagonista de HGF/c-met que es o comprende un polipéptido (por ejemplo, un mutante/variante de HGF). Un ácido nucleico puede codificar un antagonista de HGF/c-met que es o comprende un anticuerpo o fragmento del mismo.

[0040] En un aspecto, la presente invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

[0041] En un aspecto, la presente invención proporciona células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante, tal como un vector de expresión. Se puede utilizar cualquiera de un conjunto de células huésped. En una realización, una célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, E. coli. En una realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO).

[0042] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir un antagonista de HGF/c-met de la invención tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la presente invención proporciona un método de producción de un antagonista de HGF/c-met que es o comprende un polipéptido (tal como un mutante/variante de HGF), comprendiendo dicho método expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante de la invención que codifica dicho polipéptido, y recuperar dicho polipéptido.

[0043] En un aspecto, la presente invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida en el recipiente, en el que la composición comprende uno o más antagonistas de HGF/c-met de la invención tal como se define en las reivindicaciones. La composición puede comprender un ácido nucleico de la invención. En una realización, una composición que comprende un antagonista de HGF/c-met comprender además un portador, que, en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación de la invención comprende además instrucciones para administrar la composición al sujeto.

[0044] También se describe en este documento un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más antagonistas de HGF/c-met de la invención; y un segundo recipiente que comprende un tampón. En un ejemplo, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, una composición que comprende un antagonista de HGF/c-met comprender además un portador, que, en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición al sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0045]

Figura 1 (A) representa la caracterización de varios mutantes de HGF. Se ejemplifican mutantes de la inserción N-terminal de la cadena β de HGF y la dimerización de la cadena β de HGF. Los datos de "migración celular" se refieren a la migración de células MDA-MB435 en presencia de HGF de longitud completa que contenían la mutación o mutaciones indicadas, expresada como el porcentaje de migración en presencia de HGF de tipo natural. Los datos de "unión HGF β /MetIgG" se refieren a la unión de la cadena β de HGF (que contiene la mutación o mutaciones indicadas) a MetIgG, expresada como la proporción de IC_{50} (mutante) con respecto a IC_{50} (tipo natural) en un ensayo de unión de competición. En estos datos, WT se refiere al mutante C604S; los mutantes de cadena β de HGF también contenían esta mutación. Nota: Como referencia general, las mutaciones se indican en negrita si se espera que alteren las potenciales interacciones de cadena β -cadena β , y las mutaciones se indican en cursiva y subrayadas (negrita o no negrita) si se espera que alteren la inserción del N-terminal. Estas suposiciones se basan en el efecto predominante observado o esperado para las respectivas mutaciones, es decir, el efecto en las interacciones de cadena β -cadena β o la capacidad del extremo N-terminal de la de cadena β de insertarse en un sitio activo/bolsillo de unión. A pesar de esto, el experto en la materia sería capaz de determinar fácilmente si una mutación particular tendría uno o ambos efectos, ya se indique o no en la figura 1A. Por ejemplo, en algunos casos, una mutación puede afectar a las interacciones de cadena β -cadena β y a la inserción del extremo N-terminal, o en algunos casos, una mutación indicada en la figura 1A que se espera que afecte a las interacciones de cadena β -cadena β se puede mostrar empíricamente que afecta a la inserción del extremo N-terminal. De manera similar, los valores de unión a Met aparentemente "impedidos" se indican en cursiva y los valores de unión aparentemente "normales" se indican en negrita, aunque el grado de "impedimento" y "normalidad" es relativo.

(B) Unión de HGF de longitud completa que contiene la mutación o mutaciones indicadas a Met medida en un ensayo de unión de competición. Los datos se expresan como la proporción de IC_{50} (mutante) con respecto a IC_{50} (tipo natural).

(C) Inhibición de la migración y la proliferación celular por el HGF de longitud completa que contiene la mutación o mutaciones indicadas. La cantidad de actividad de migración y proliferación celular, respectivamente, en presencia de HGF mutante y HGF de tipo natural (HGF de tipo natural 1 nM para la migración; HGF de tipo natural 0,25 nM para la proliferación) se expresa como el porcentaje de actividad observada en presencia de HGF de tipo natural solo.

Figura 2 (A) Inhibición de la fosforilación de Met dependiente de HGF en células A549 por mutantes de HGF tal como se indica; R424A: R494E se refiere a HGF de cadena única. La cantidad de fosforilación de Met se indica como RLU (unidad relativa de luz). (B) Inhibición de la fosforilación de Met dependiente de HGF en células de carcinoma de pulmón A549 por mutantes de HGF tal como se indica. La cantidad de fosforilación de Met se indica como el porcentaje de control (que es la cantidad observada en presencia de HGF de tipo natural 0,5 nM).

Figuras 3(A) y (B) Fosforilación de Met en células A549 en presencia de HGF de tipo natural y mutante. La cantidad de fosforilación de Met se indica como el porcentaje de fosforilación máxima observada en presencia de HGF de tipo natural a cada una de las respectivas concentraciones de HGF de tipo natural.

Figura 4. Actividad angiogénica en presencia de HGF mutante. La cantidad de angiogénesis se indica como el número de brotes/partícula en presencia de los mutantes de HGF indicados.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

[0046] La presente invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para modular la ruta de señalización de HGF/c-met.

[0047] En el presente documento se proporcionan detalles de estos métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación.

5 *Técnicas generales*

[0048] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988).

15 *Definiciones*

[0049] Tal como se emplean en este documento, las referencias a los nombres de aminoácidos pueden ser las designaciones aceptadas en el sector en una o más de las siguientes formas, todas ellas utilizadas de forma intercambiable en este documento: (i) nombre completo (por ejemplo, triptófano, serina, glicina, etc.), (ii) abreviaturas de tres letras (por ejemplo, Trp, Ser, Gly, etc.), y (iii) designaciones de una letra (por ejemplo, W, S, G, etc.).

[0050] "Porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptido o polipéptido se define como el porcentaje de los residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de péptido o polipéptido específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar cualquiera sustitución conservativa como parte de la identidad en la secuencia. El alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro del alcance de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para alcanzar el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad en la secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.828.146.

[0051] Tal como se utiliza en este documento, los términos "péptido" y "polipéptido" se utilizan de forma intercambiable, a excepción de que el término "péptido" se refiere, en general, a un polipéptido que comprende menos de 200 aminoácidos contiguos. El término "péptido", en general, se refiere a una secuencia contigua y relativamente corta de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Habitualmente, pero no necesariamente, un péptido tiene una longitud de aproximadamente 2 a 50 aminoácidos, 4-40 aminoácidos o 10-30 aminoácidos.

[0052] El término "vector", tal como se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector en fago. Otro tipo de vector es un vector viral, donde segmentos adicionales de ADN pueden ligarse en el genoma viral. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de este modo, se replican junto con el genoma del huésped. Además, algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan en este documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable puesto que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

[0053] "Polinucleótido" o "ácido nucleico", tal como se usan de forma intercambiable en este documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que puede incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción de síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura nucleotídica puede realizarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como mediante conjugación con una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, caperuzas ("*caps*"), sustitución de uno o más de los

nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fósforotioatos, fósforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido (o de los polinucleótidos). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos mediante grupos protectores convencionales, o activados para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse a soportes sólidos o semi-sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse por aminas o restos orgánicos de grupos formadores de caperuzas de desde 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en el sector, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, pseudoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse mediante grupos enlazantes alternativos. Estos grupos enlazantes alternativos incluyen, aunque sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR.sub.2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH.sub.2 ("formacetal"), donde cada uno de R o R' es independientemente H o alquilo sustituido (1-20 C.) que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La anterior descripción se aplica a todos los polinucleótidos mencionados en este documento, incluyendo ARN y ADN.

[0054] "Oligonucleótido" tal como se usa en este documento, se refiere en general a polinucleótidos cortos, generalmente de cadena sencilla, generalmente sintéticos, que en general, pero no necesariamente, tienen menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a oligonucleótidos.

[0055] El término "factor de crecimiento de hepatocitos" o "HGF", tal como se usa en este documento, se refiere, a menos que se indique específicamente lo contrario, a cualquier polipéptido de HGF nativo o variante (ya sea nativo o sintético) que es capaz de activar la ruta de señalización de HGF/c-met en condiciones que permiten que tenga lugar dicho proceso. El término "HGF de tipo natural" se refiere en general a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína de HGF de origen natural. El término "secuencia de HGF de tipo natural" se refiere en general a una secuencia de aminoácidos que se encuentra en un HGF de origen natural.

[0056] Las frases "que no impide sustancialmente", "no reduce sustancialmente", "son sustancialmente similares" o "son sustancialmente equivalentes", y variaciones de las mismas, tal como se utilizan en este documento, indican un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos, de manera que un experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores como de significancia biológica pequeña o nula en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores. La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente inferior a aproximadamente el 50%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 40%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 30%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 20%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 10%. Los ejemplos de "dos valores numéricos" incluyen un valor asociado con una proteína de tipo natural y un valor asociado con una forma mutada de dicha proteína.

[0057] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de forma intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (tal como se describe con más detalle en este documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado para afinidad.

[0058] "Fragmentos de anticuerpo" comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, donde la parte preferentemente conserva al menos una, preferentemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un punto de unión al antígeno del anticuerpo intacto y por lo tanto conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión al antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

[0059] El término "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, al estar dirigidos contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que habitualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno.

[0060] Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[0061] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima obtenida de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de estudio y referencias citadas en esos documentos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1.038 (1995); Hurlle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).

[0062] Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se ha descrito en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

[0063] Un anticuerpo "madurado para afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados para afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en el sector. Marks et al. Bio/technology 10: 779-783 (1992) describe maduración para afinidad mediante cambios de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o armazón se describe por: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155(1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol, 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

[0064] Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

[0065] Un "anticuerpo agonista", tal como se usa en este documento, es un anticuerpo que mimetiza por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

[0066] Un "trastorno" o "afección patológica" es cualquier afección que podría beneficiarse del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero para el trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en este documento incluyen tumores o cánceres malignos y benignos; tumores no de leucemia y linfoides; trastornos neuronal, glial, astrocítico, hipotalámico y otros trastornos glandulares, macrófágicos, epiteliales, estromáticos y blastocéllicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos, neurodegenerativos, relacionados con la angiogénesis y trastornos relacionados con efectos mitocondriales o metabólicos.

[0067] Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

5 **[0068]** "Tumor", tal como se usa en este documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no se excluyen mutuamente cuando se mencionan en este documento.

10 **[0069]** Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento/proliferación celular no regulada. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen mieloma múltiple, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón macrocítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello del útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

20 **[0070]** Tal como se usa en este documento, "tratamiento" se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo o célula que se está tratando, y puede realizarse por profilaxis o durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir la metástasis, reducir la velocidad de avance de la enfermedad, mejoría o alivio del estado de la enfermedad, y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se usan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

25 **[0071]** Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

30 **[0072]** Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista puede variar según factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista es mucho menor que los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una fase temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

35 **[0073]** El término "agente citotóxico", tal como se usa en este documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de células y/o causa la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides de vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer que se describen posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

40 **[0074]** Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclosfosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina I y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM 1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gammall y caliqueamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como neocarzinostatina cromóforo y cromóforos de antibiótico de la

cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitostanol, mepitostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico tales como ácido frofínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatrxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguaazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofílico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremofor, formulación de nanopartículas de paclitaxel con inserción de albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptapurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0075] También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico" anterior agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como anti-estrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON; inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®; y anti-andrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0076] Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende de la activación de HGF/c-met *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes de HGF/c-met en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y detención en la fase M. Los bloqueantes de fase M convencionales incluyen los vinca (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también extienden su acción a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" de Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pág. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer que se obtienen ambos del árbol del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), obtenido del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos impidiendo la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

[0077] "Doxorrubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

Antagonistas de HGF/Met - péptidos/polipéptidos (incluyendo anticuerpos)

[0078] Un aspecto de la descripción de este documento se refiere a moduladores de péptido/polipéptido y anticuerpo aislados de la interacción de cadena β -cadena β de HGF y la interacción de HGF-Met. Los moduladores (tales como péptidos/polipéptidos y anticuerpos) se pueden aislar de células o fuentes de tejido mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas de purificación de proteína estándar. En otro ejemplo, los moduladores se producen mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa a la expresión recombinante, los moduladores se pueden sintetizar químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos estándar.

[0079] Las moléculas antagonistas de HGF/Met incluyen las descritas en la figura 1. La descripción del presente documento también proporciona una proteína mutante o variante, en la cual los residuos se pueden cambiar de los residuos correspondientes de estos péptidos/polipéptidos, mientras se codifica un péptido/polipéptido que mantiene la actividad moduladora. Una variante de un antagonista de péptido/polipéptido puede tener por lo menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de un antagonista de péptido/polipéptido de referencia. En general, la variante muestra sustancialmente una afinidad de unión igual o superior al antagonista de péptido/polipéptido de unión de referencia, por ejemplo, por lo menos 0,75 veces, 0,8 veces, 0,9 veces, 1,0 veces, 1,25 veces ó 1,5 veces la afinidad de unión del péptido/polipéptido/ligando de unión de referencia, basado en la unidad de cuantificación/métrica del ensayo de unión aceptado en la técnica, a la vez que se mantiene un grado deseable de actividad antagonista.

[0080] En general, las variantes incluyen variantes en las que residuos en una posición particular en la secuencia se han sustituido por otros aminoácidos, y además incluyen la posibilidad de insertar un residuo o residuos adicionales entre dos residuos de la proteína/péptido parental, así como la posibilidad de eliminar uno o más residuos de la secuencia parental o añadir uno o más residuos a la secuencia parental. Cualquier sustitución, inserción o delección de aminoácido está comprendido por la invención. En circunstancias favorables, la sustitución es una sustitución conservativa tal como se describe en este documento.

[0081] Un péptido, polipéptido, proteína o fragmento biológicamente activo "aislado" o "purificado" se separa y/o recupera de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes incluyen materiales que habitualmente interferirían con los usos diagnóstico o terapéutico para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros materiales proteínicos o no proteínicos. Las preparaciones que tienen preferiblemente menos del 30% en peso en seco de material contaminante no deseado (contaminantes), preferiblemente inferior al 20%, 10% y preferiblemente inferior al 5% de contaminantes, se consideran que están sustancialmente aislados. Un péptido/polipéptido producido recombinantemente aislado o una parte biológicamente activa de los mismos está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa preferiblemente menos del 20%, preferiblemente menos de aproximadamente el 10%, y preferiblemente menos de aproximadamente el 5% del volumen de una preparación de péptido/polipéptido. Los ejemplos de contaminantes incluyen restos celulares, medio de cultivo, y sustancias utilizadas y producidas durante la síntesis in vitro del péptido/polipéptido.

[0082] En la tabla A se muestran sustituciones conservativas de péptidos/polipéptidos bajo el título de "sustituciones preferentes". Si estas sustituciones dan lugar a una modificación de la actividad biológica, entonces se pueden introducir más modificaciones sustanciales, denominadas "sustituciones de ejemplo" en la Tabla A o, tal como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácido, y se criban los productos.

Tabla A

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr (T)	ser	ser

Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0083] Se realizan modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del péptido/polipéptido mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, en conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: gly, pro, y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0084] Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

[0085] Las variantes de moduladores de anticuerpo también se pueden producir en base a información conocida en el sector, sin afectar sustancialmente a la actividad del anticuerpo. Por ejemplo, las variantes de anticuerpo pueden tener por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida por un residuo diferente. Para los anticuerpos, los puntos de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen generalmente las regiones hipervariables, pero también se contemplan las alteraciones de la región de armazón (FR).

[0086] Para los anticuerpos, un tipo de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración para afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se expresan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetada en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe aquí. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas aquí. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe aquí y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para un desarrollo posterior.

[0087] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

[0088] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de polipéptidos inmunoglobulina de la invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

[0089] En una realización, la variante de la región Fc puede mostrar una afinidad de unión al receptor de Fc neonatal alterada (FcRn). Dichas regiones Fc variantes pueden comprender una modificación de aminoácido en alguna o más de las posiciones de aminoácido 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 ó 447 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Las variantes de la región Fc con unión reducida a un FcRn pueden comprender una modificación de aminoácido en alguna o más de las posiciones de aminoácido 252, 253, 254, 255, 288, 309, 386, 388, 400, 415, 433, 435, 436, 439 ó 447 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Como alternativa, las variantes de la región Fc mencionadas anteriormente pueden mostrar una unión incrementada a FcRn y comprenden una modificación de aminoácido en alguna o más de las posiciones de aminoácido 238, 256,

265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 ó 434 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

5 **[0090]** La variante de la región Fc con una unión reducida a un Fc γ R puede comprender una modificación de aminoácido en alguna o más de las posiciones de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 ó 439 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

10 **[0091]** Por ejemplo, la variante de la región Fc puede mostrar una unión reducida a un Fc γ RI y comprende una modificación de aminoácido en alguna o más de las posiciones de aminoácido 238, 265, 269, 270, 327 ó 329 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

15 **[0092]** La variante de la región Fc puede mostrar una unión reducida a un Fc γ RIII y comprende una modificación de aminoácido en alguna o más de las posiciones de aminoácido 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 ó 439 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

20 **[0093]** La variante de la región Fc de interés puede mostrar una unión reducida a un Fc γ RIII y comprende una modificación de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácido 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 ó 437 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat.

25 **[0094]** Las variantes de la región de Fc con una unión a Clq y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC) alteradas (es decir, aumentada o disminuida) se describen en el documento WO99/51642. Dichas variantes pueden comprender una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones de aminoácidos 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 ó 334 de la región Fc. Véase también, Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); patente de Estados Unidos No. 5.648.260; patente de Estados Unidos No. 5.624.821; y WO94/29351 referente a las variantes de la
30 región Fc.

Construcción de vectores

35 **[0095]** Las secuencias de polinucleótidos que codifican los péptidos/polipéptidos descritos en este documento pueden obtenerse usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células fuente apropiadas. Las células fuente para anticuerpos incluirían células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que
40 codifican las inmunoglobulinas se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en una célula huésped. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en el sector pueden usarse para los fines de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del
45 vector generalmente incluyen, pero sin limitación: un origen de replicación (en particular cuando el vector se inserta en una célula procarionta), un gen marcador de selección, un promotor, un punto de unión al ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

50 **[0096]** En general, los vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que se obtienen de una especie compatible con la célula huésped se usan junto con estos huéspedes. El vector habitualmente tiene un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente usando pBR322, un plásmido obtenido de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por lo tanto, proporciona medios sencillos para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros
55 plásmidos microbianos o bacteriófago también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden ser usados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas.

60 **[0097]** Además, se pueden utilizar vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped, como vectores transformantes junto con estos huéspedes. Por ejemplo, pueden utilizarse bacteriófagos tales como λ GEM.TM.-11 para preparar un vector recombinante que puede usarse para transformar células huésped susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

65 **[0098]** En la presente invención pueden utilizarse promotores constitutivos o inducibles, según las necesidades de una situación particular, que puede ser evaluada por un experto en la materia. Se conoce un gran número de promotores reconocidos por diversas células huésped potenciales. El promotor seleccionado puede estar unido de forma operativa al ADN cistron que codifica un polipéptido descrito en este documento extrayendo el promotor del

ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de elección. Pueden usarse la secuencia promotora nativa y muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. Sin embargo, se prefieren promotores heterólogos, puesto que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

[0099] Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, con lo que se permite a un experto en la materia unirlos de forma operativa a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

[0100] En algunas realizaciones, cada cistrón en un vector recombinante comprende una componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para los fines de la presente invención debe ser una que sea reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen ni procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o secuencias líderes de enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP.

[0101] Las células huésped procariotas adecuadas para expresar polipéptidos incluyen Archeobacterias y Eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (por ejemplo, *E. coli*), Bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de Pseudomonas (por ejemplo, *P. aeruginosa*), Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, o Paracoccus. Preferentemente, se usan células gram-negativas. Preferentemente la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y de manera deseable pueden incorporarse inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

Producción de péptidos/polipéptidos

[0102] Las células huésped se transforman o transfectan con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0103] Transfección se refiere la captación de un vector de expresión por una célula huésped, se expresen o no de cualquier secuencia codificante. El experto en la materia conoce muchos métodos de transfección, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. La transfección con éxito se reconoce generalmente cuando cualquier indicación del funcionamiento de este vector se produce en la célula huésped.

[0104] Transformación significa introducir ADN en el huésped procariota, de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o mediante un integrante del cromosoma. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras de la pared celular sustanciales. Otro método de transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica usada es la electroporación.

[0105] Las células procariotas usadas para producir los péptidos/polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en el sector y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo luria (LB) más suplementos de nutrientes necesarios. En realizaciones preferidas, el medio también contiene un agente de selección, seleccionado en base a la construcción del vector de expresión, para permitir de forma selectiva el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el cultivo de células que expresan un gen de resistencia a ampicilina.

[0106] También pueden incluirse cualquier suplemento necesario, además de fuentes de carbono, nitrógeno, y fosfato inorgánico, a concentraciones apropiadas introducidas en solitario o en forma de mezcla con otro suplemento o medio, tal como una fuente compleja de nitrógeno. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiotritol y ditiotreitól.

[0107] Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida varía entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 39°C, más

preferentemente entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, aún más preferentemente a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía entre aproximadamente 5 y aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH está preferentemente entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,4, y más preferentemente aproximadamente 7,0.

[0108] Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión, se induce la expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. Por ejemplo, si se usa un promotor PhoA para controlar la transcripción, las células huésped transformadas pueden cultivarse en un medio limitante de fosfato para la inducción. Pueden usarse diversos inductores diferentes, según la construcción de vector empleada, tal como se conoce en el sector.

[0109] Los péptidos/polipéptidos descritos en este documento expresados en un microorganismo pueden secretarse en y recuperarse del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas habitualmente implica romper los microorganismos, generalmente mediante medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se han roto las células, los restos celulares o las células completas pueden extraerse mediante centrifugado o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad en resina. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse de éste. Las células pueden extraerse del cultivo y el sobrenadante del cultivo puede filtrarse y concentrarse para una purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos conocidos habitualmente, tales como fraccionamiento en columnas de inmutofinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatofenofque; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; resinas de afinidad hidrofóbica, afinidad de ligando usando un antígeno adecuado inmovilizado en una matriz y ensayo de transferencia Western.

[0110] Además de las células huésped procariotas, los sistemas de células huésped eucariotas también están bien establecidos en el sector. Los huéspedes adecuados incluyen líneas celulares de mamífero, tales como CHO, y células de insecto, tales como las que se describen posteriormente.

Purificación de péptidos/polipéptidos

[0111] Los péptidos/polipéptidos que se producen pueden purificarse para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos convencionales de purificación de proteínas conocidos en el sector. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmutofinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatofenofque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

Métodos de la invención

[0112] La invención proporciona diversos métodos basados en el descubrimiento de que mutaciones en ciertas regiones de la cadena β de HGF dan lugar a la modificación de las actividades biológicas de la molécula, mediante lo cual dichas moléculas mutantes muestran efectos antagónicos en la modulación de la ruta de HGF/Met.

[0113] Pueden utilizarse diversas sustancias o moléculas (incluyendo péptidos/polipéptidos, etc.) como agentes terapéuticos según los métodos descritos en el presente documento. Estas sustancias o moléculas pueden formularse según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales el producto de éstas se combina en una mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Se preparan formulaciones terapéuticas para el almacenamiento mezclando el principio activo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEENT™, PLURONICS™ o PEG.

[0114] Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución.

[0115] Las composiciones terapéuticas en este documento generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

[0116] La vía de administración es según métodos conocidos, por ejemplo inyección o infusión mediante las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica o mediante sistemas de liberación sostenida.

[0117] Las dosificaciones y concentraciones de fármacos deseadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiada está al alcance de un médico especialista. Los experimentos en animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para terapia humana. El escalado entre especies de dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios expuestos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-96.

[0118] Cuando se emplea la administración *in vivo* de una sustancia o molécula de la invención, las cantidades de dosificación normales pueden variar entre aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más al día, preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se proporciona una guía sobre dosificaciones y métodos de administración particulares; véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos N.º. 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede requerir la administración de una manera diferente de la dirigida a otro órgano o tejido.

[0119] Cuando se desea la administración de liberación sostenida de una sustancia o molécula en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere la administración de la sustancia o molécula, se contempla la microencapsulación de la sustancia o molécula. La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha realizado con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleuquina-2, y MN rgp120. Johnson et al., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds. (Plenum Press: New York, 1995), pág. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y patente de Estados Unidos No. 5,654,010.

[0120] Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de ácido poliláctico-glicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, pueden eliminarse rápidamente del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero puede ajustarse de meses a años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), págs. 1-41.

[0121] La identificación de regiones en la cadena β de HGF que son críticas para la función de HGF en la ruta de señalización de HGF/Met proporciona sitios en la cadena β de HGF contra los que se pueden dirigir los antagonistas. Ejemplos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido (que puede ser un aptámero) que se une al extremo N-terminal y/o regiones de dimerización de la cadena β de HGF y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que son capaces de unirse a una molécula diana. La generación y uso terapéutico de aptámeros están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.475.096, y la eficacia terapéutica de Macugen® (Eyeteq, Nueva York) para tratar la degeneración macular relacionada con la edad.

[0122] Tal como se describe en este documento, una sustancia/molécula antagonista de HGF/Met puede ser un péptido o polipéptido (incluyendo un anticuerpo). Los métodos para obtener dichos péptidos y polipéptidos se conocen bien en el sector, e incluyen cribar bibliotecas de péptidos y polipéptidos para enlazantes a un antígeno diana adecuado. En un ejemplo, los antígenos diana adecuados comprenderían la cadena β de HGF (o una parte de la misma que comprende la región N-terminal y/o la región de dimerización), que se describe con detalle en este documento. En un ejemplo, los antígenos diana adecuados comprenderían Met, por ejemplo, el dominio extracelular de Met. Las bibliotecas de péptidos y polipéptidos son conocidos en el sector y también se pueden preparar según los métodos del sector. Véase, por ejemplo, Clark et al., patentes de Estados Unidos Nos. 6.121.416; y Garrard et al., 5.750.373, 5.733.743, 5.837.242, 5.969.108, 6.172.197, 5.580.717, y 5.658.727. Las bibliotecas de péptidos y polipéptidos fusionadas a un componente de proteína heteróloga, tal como una proteína de la envuelta de un fago, se conocen bien en el sector, por ejemplo, como se describe en Clark et al. y Garrard et al., supra. Las variantes de un primer enlazador peptídico o polipeptídico pueden generarse cribando mutantes del péptido o polipéptido para obtener las características de interés (por ejemplo, potenciar la afinidad de unión a la diana, farmacocinética potenciada, toxicidad reducida, índice terapéutico mejorado, etc.). Por ejemplo, una característica de interés puede ser la capacidad de unirse a Met, pero una capacidad reducida de activar actividades biológicas relacionadas con HGF activado, tales como proliferación celular, fosforilación de Met, migración celular y angiogénesis. Las técnicas

de mutagénesis se conocen bien en el sector y las regiones para la mutación estarían dentro de la cadena β de HGF, en particular posiciones asociadas con la inserción N-terminal de la cadena β de HGF y/o la dimerización cadena β -cadena β , tal como se describe en el presente documento. Además, las técnicas de mutagénesis de barrido (tales como las que se basan en barrido de alanina) pueden ser especialmente útiles para evaluar la importancia estructural y/o funcional de los residuos de aminoácidos individuales en un péptido o polipéptido.

[0123] La determinación de la capacidad de una sustancia/molécula candidata de la invención para modular la señalización de HGF/c-met y/o actividades biológicas asociadas con dicha señalización, puede realizarse analizando la capacidad moduladora de la sustancia/molécula en ensayos *in vitro* o *in vivo*, que están bien establecidos en el sector, por ejemplo, como se describe en Okigaki et al., supra; Matsumoto et al., supra; Date et al., FEBS Lett. (1997), 420:1-6; Lokker et al., supra; Hartmann et al., supra; Kirchhofer et al., J Biol. Chem. (2004), 279:39915-24; Stamos et al. (2004) EMBO J. 23: 2325-35; Kirchhofer et al., FEBS Lett. (2005) 579: 1945-50; y Nakatsu et al. (Microvasc.Res. 66: 102,2003).

15 Anticuerpos contra cadena β de HGF

[0124] El presente documento describe métodos que comprenden el uso de anticuerpos. Los anticuerpos de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

20 1. Anticuerpos policlonales

[0125] Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por los expertos en la materia. Pueden generarse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir una cadena β de HGF activada (o una parte de la misma) o una proteína de fusión de la misma. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunógena en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por un experto en la materia sin gran experimentación.

35 2. Anticuerpos monoclonales

[0126] Los anticuerpos pueden ser, como alternativa, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro huésped animal apropiado, se inmuniza habitualmente con un agente inmunizante para generar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

[0127] El agente inmunizante incluirá habitualmente la cadena β de HGF (o una parte de la misma) o una proteína de fusión de la misma. Generalmente, se usan linfocitos de la sangre periférica ("PBL"), si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero de origen no humano. Los linfocitos se fusionan a continuación con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células no fusionadas inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas habitualmente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0128] Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan eficazmente, soportan una expresión estable a nivel elevado de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murinas, que pueden obtenerse, por ejemplo, a partir del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos humanos monoclonales [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63].

[0129] A continuación puede analizarse la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la cadena β de HGF en el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan. Preferentemente, la especificidad de

unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en el sector. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

[0130] Una vez que las células de hibridoma deseadas se han identificado, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales [Goding, supra]. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

[0131] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o líquido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[0132] Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinantes, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfieren en células huésped, tales como células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humana por las secuencias homólogas murinas [patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al., supra] o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia que codifica un polipéptido no de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un punto de combinación con un antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

[0133] Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen bien en el sector. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc para impedir la reticulación de la cadena pesada. Como alternativa, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para impedir la reticulación.

[0134] Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en el sector.

[0135] También pueden generarse anticuerpos cribando bibliotecas de expresión en fagos para anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen con afinidad adecuada/deseable a la cadena β de HGF (o equivalente). Dichas técnicas se conocen bien en el sector, por ejemplo, tal como se describen en las patentes de Estados Unidos N°. 5.750.373; 5.780.279; 5.821.047; 6.040.136; 5.427.908; 5.580.717, y referencias en esos documentos.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0136] Los anticuerpos contra la cadena β de HGF pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contienen una mínima secuencia obtenida de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o de armazón importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

[0137] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en el sector. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan como residuos "importados", que habitualmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de puntos análogos en anticuerpos de roedor.

[0138] Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en el sector, incluyendo bibliotecas de expresión en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al., y Boerner et al., también están disponibles para la preparación de anticuerpos humanos monoclonales (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. Análogamente, pueden prepararse anticuerpos humanos mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Después de la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación génica, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

[0139] Los anticuerpos también pueden madurar su afinidad usando métodos de selección y/o mutagénesis conocidos, como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos de afinidad madurada preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, aún más preferentemente 20 o 30 veces mayor que el anticuerpo de partida (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado.

4. Anticuerpos biespecíficos

[0140] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por la cadena β de HGF, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferentemente por una proteína o receptor o subunidad receptora de la superficie celular.

[0141] Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en el sector. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

[0142] Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación de anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el punto necesario para la unión a la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión diferentes, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

[0143] Según otra estrategia descrita en el documento WO 96/27011, el interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. El interfaz preferido comprende por lo menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos del interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano).

Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en el interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo grandes cadenas laterales de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0144] Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan et al., Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditioi, arsenito sódico, para estabilizar ditioles vecinales e impedir la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Los Fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tioi mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0145] Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado de F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas tumores de mama humanos.

[0146] También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) proporcionó un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando de este modo dos puntos de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena sencilla (sFv). Véase, Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994).

[0147] Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

[0148] Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos epítomos diferentes en la cadena β de HGF o a un epítomo en la cadena β de HGF y a un epítomo en otro polipéptido (por ejemplo, c-met o cadena α de HGF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

[0149] Los anticuerpos heteroconjugados también se describen en el presente documento. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos N° 4.676.980], y para el tratamiento de infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

6. Manipulación de la función efectora

[0150] Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, pueden introducirse un residuo o residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de puentes disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción celular mediada por el complemento y mayor citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992).

Los anticuerpos homodiméricos con actividad anti-tumoral aumentada también pueden prepararse usando reticulantes heterobifuncionales, tal como se describe en Wolff et al. *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y de este modo pueda tener capacidades potenciadas de lisis del complemento y ADCC. Véase Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989).

7. Inmunconjugados

[0151] En el presente documento se describen inmunconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0152] Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunconjugados se han descrito anteriormente. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse se incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Están disponibles diversos radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando diversos agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante de ejemplo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase el documento W094/ 11026.

[0153] En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (como estreptavidina) para la utilización en el pre-reconocimiento de tumores donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

8. Inmunoliposomas

[0154] Los anticuerpos descritos en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo mediante métodos conocidos en el sector, tales como los descritos en Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); y patente de Estados Unidos Nos. 4,485,045 y 4,544,545. Los liposomas con un tiempo de circulación aumentado se describen en la patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

[0155] Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de un tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas, tal como se describe en Martin et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina) está contenido opcionalmente dentro del liposoma. Véase Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.*, 81(19); 1484 (1989).

9. Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

[0156] Los anticuerpos pueden administrarse para el tratamiento de diversos trastornos en forma de composiciones farmacéuticas.

[0157] Si se usan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también pueden usarse lipofecciones o liposomas para liberar anticuerpos de la invención en células cuando esto sea deseable. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas de péptido o polipéptido que conservan su capacidad de unirse a la cadena β de HGF y/o interferir con la interacción entre la cadena β de HGF y c-met. Dichos péptidos y polipéptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993). La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la afección particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no

se afectan de forma adversa entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

[0158] Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.

[0159] Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0160] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o alcohol poli(vinílico), poliláctidos (patente de Estados Unidos N°. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas intyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios de inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de puentes S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

[0161] Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que diversas realizaciones más pueden ponerse en práctica, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

[0162] Se generaron mutantes de HGF esencialmente tal como se describe en Kirchhofer et al., J Biol. Chem. (2004), 279:39915-24; Stamos et al. (2004) EMBO J. 23: 2325-35. Los ensayos de unión a Met y migración de células MDA-MB435 se realizaron utilizando reactivos y métodos tal como se describe en Kirchhofer et al., supra. y Stamos et al., supra. Los ensayos de fosforilación de Met se llevaron a cabo utilizando células A549 esencialmente tal como se describe en Kirchhofer et al., supra. La inhibición de la fosforilación de Met se llevó a cabo de manera similar, a excepción de que se añadieron mutantes de HGF de una manera dependiente con la dosis para inhibir la fosforilación utilizando HGF 50 ng/ml. La inhibición de la proliferación celular se llevó a cabo en ensayos BxPC3 esencialmente tal como se describe en Kirchhofer et al., FEBS Lett. (2005) 579: 1945-50. El ensayo de angiogénesis *in vitro* se llevó a cabo esencialmente tal como se describe por Nakatsu et al. (Microvasc.Res. 66: 102, 2003). Los mutantes de HGF se añadieron al medio de cultivo a una concentración de 10 μ g/ml cada dos días durante un experimento de 6 días. Al final del experimento se cuantificó el número de brotes por partícula y se expresó como el promedio \pm SD de 4 experimentos independientes.

RESULTADOS

[0163] Los mutantes de la cadena β de HGF (como cadena β sola y HGF de longitud completa), que tienen las mutaciones indicadas, se caracterizaron por la capacidad de unirse a MetIlgG, en comparación con la cadena β de HGF de tipo natural (cadena β sola y HGF de longitud completa) utilizando un ensayo ELISA de competición. A efectos de minimizar cualquier potencial formación de dímeros unidos a disulfuro, se produjeron cadena β de HGF de tipo natural y mutantes de de cadena β de HGF en la base de C604S; de este modo, la cadena β de HGF de tipo natural es realmente C604S con cadena β de HGF. Además, se evaluaron mutantes de HGF de 2 cadenas de longitud completa en un ensayo de migración celular para determinar los efectos, si los hay, sobre la función biológica, como resultado de las mutaciones en la cadena β . Los resultados se representan en la figura 1A,B,C. El mutante de HGF G498I inhibía la fosforilación dependiente de HGF de Met de una manera dependiente de la dosis tal como se representa en la figura 2; también se muestran los resultados para el mutante de HGF R424A:R494E (HGF de cadena sencilla). Los mutantes de HGF G498I y G498P activan Met significativamente menos bien en comparación con el HGF de tipo natural en el ensayo de fosforilación de Met tal como se representa en la figura 3; ;

también se muestran los resultados para el mutante de HGF R424A:R494E. La fosforilación dependiente de HGF de Met se moduló de una manera dependiente de la dosis. Los mutantes de HGF G498I y G498P también inhibieron la proliferación de células BxPC3, que tenían un 2,5% y un 56% de la actividad de HGF de tipo natural. Además, los mutantes de HGF de longitud completa seleccionados a una concentración de 10 µg/ml (D672N, V495G, G498I, R424A:R494E) inhibieron la angiogénesis en un ensayo in vitro (Figura 4), confirmando adicionalmente de este modo la significancia de la cadena β de HGF (y las mutaciones seleccionadas de la misma) en la función biológica general de HGF.

LISTA PARCIAL DE REFERENCIAS

[0164]

- Angeloni, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Leonard, E. J., and Lerman, M. L. (2004). The soluble sema domain of the RON receptor inhibits MSP-induced receptor activation. *J. Biol. Chem.*, 279, 3726-3732.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925.
- Boose, J. A., Kuismanen, E., Gerard, R., Sambrook, J., and Gething, M. J. (1989). The single-chain form of tissue type plasminogen activator has catalytic activity: Studies with a mutant enzyme that lacks the cleavage site. *Biochemistry* 28, 638-643.
- Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.
- Broze Jr., G. J. (2001). Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb. Haemost.* 86, 8-13.
- CCP4 (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D* 50, 760-763.
- Chirgadze et al., *FEBS Letters* (1998), 430:126-129.
- Cohen, G. H. (1997). Align - a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions. *J Appl. Crystallog.* 30, 1160-1161.
- Cooper, C. S., Blair, D. G., Oskarsson, M. K., Tainsky, M. A., Eader, L. A., and Vande Woude, G. F. (1984a). Characterization of human transforming genes from chemically transformed, teratocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 44, 1-10.
- Cooper, C. S., Park, M., Blair, D. G., Tainsky, M. A., Huebner, K., Croce, C. M., and Vande Woude, G. F. (1984b). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29-33.
- Danilkovitch, A., Miller, M., and Leonard, E. J. (1999). Interaction of macrophage-stimulating protein with its receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 29937-29943.
- Danilkovitch-Miagkova, A., and Zbar, B. (2002). Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *J. Clin. Invest.* 109, 863-867.
- Date et al., *FEBS Lett.* (1997), 420:1-6.
- Dennis, M. S., Eigenbrot, C., Skelton, N. J., Ultsch, M. H., Santell, L., Dwyer, M. A., O'Connell, M. P., and Lazarus, R. A. (2000). Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature* 404, 465-470.
- Derksen, P. W., Keehnen, R. M. J., Evers, L. M., van Oers, M. H. J., Spaargaren, M., and Pals, S. T. (2002). Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signalling in multiple myeloma. *Blood* 99, 1405-1410.
- Di Cera, E., Guinto, E. R., Vindigni, A., Dang, Q. D., Ayala, Y. M., Wuyi, M., and Tulinsky, A. (1995). The Na⁺ binding site of thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 22089-22092.
- Dickinson, C. D., Kelly, C. R., and Ruf, W. (1996). Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14379-14384.
- Donate, L. E., Gherardi, E., Srinivasan, N., Sowdhamini, R., Aparicio, S., and Blundell, T. L. (1994). Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci.* 3, 2378-2394.
- Drain, J., Bishop, J. R., and Hajduk, S. L. (2001). Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to Trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 30254-30260.
- Gherardi, E., Youles, M. E., Miguel, R. N., Blundell, T. L., Iamelle, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P. J. (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte-growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12039-12044.
- Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K. M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P. M., and Birchmeier, W. (1992). A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11574-11578.
- Hartmann, G., Prospero, T., Brinkmann, V., Ozcelik, C., Winter, G., Hepple, J., Batley, S., Blatt, F., Sachs, M., Birchmeier, C., et al. (1998). Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo. *Curr. Biol.* 8, 125-134.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* 102, 4501-4523.
- Huber, R., and Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc Chem. Res.* 11, 114-122.
- Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492.
- Kurosky, A., Barnett, D. R., Lee, T. H., Touchstone, B., Hay, R. E., Arnott, M. S., Bowman, B. H., and Fitch, W. M. (1980). Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3388-3392.

- Lijnen, H. R., Van Hoef, B., Nelles, L., and Collen, D. (1990). Plasminogen activation with single-chain urokinase type plasminogen activator (scu-PA). Studies with active site mutagenized plasminogen (Ser740 → Ala) and plasminresistant-scu-PA (Lys158 → Glu). *J. Biol. Chem.* 265, 5232-236.
- 5 Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A., and Dickson, R. B. (1999). Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J. Biol. Chem.* 274, 18231-18236.
- Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J.* 11, 2503-2510.
- 10 Lokker, N. A., Presta, L. G., and Godowski, P. J. (1994). Mutational analysis and molecular modeling of the N-terminal kringle-containing domain of hepatocyte growth factor identifies amino acid side chains important for interaction with the c-Met receptor. *Protein Eng.* 7, 895-903.
- Ma, P. C., Maulik, G., Christensen, J., and Salgia, R. (2003). c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 309-325.
- 15 Malkowski, M. G., Martin, P. D., Guzik, J. C., and Edwards, B. F. P. (1997). The co-crystal structure of unliganded bovine α -thrombin and prethrombin-2: movement of the Tyr-Pro-Pro-Trp segment and active site residues upon ligand binding. *Protein Sci.* 6, 1438-1448.
- Mark, M. R., Lokker, N. A., Zioncheck, T. F., Luis, E. A., and Godowski, P. J. (1992). Expression and characterization of hepatocyte growth factor receptor-IgG fusion proteins. Effects of mutations in the potential proteolytic cleavage site on processing and ligand binding. *J. Biol. Chem.* 267, 26166-26171.
- 20 Matsumoto, K., Takehara, T., Inoue, H., Hagiya, M., Shimizu, S., and Nakamura, T. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 691-699.
- Matsumoto, K., Kataoka, H., Date, K., and Nakamura, T. (1998). Cooperative interaction between α - and β -chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J. Biol. Chem.* 273, 22913-22920.
- 25 Maulik, G., Shrikhande, A., Kijima, T., Ma, P. C., Morrison, P. T., and Salgia, R. (2002). Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 41-59.
- Miller, M., and Leonard, E. J. (1998). Mode of receptor binding and activation by plasminogen-related growth factors. *FEBS Lett.* 429, 1-3.
- 30 Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028.
- Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., and Kitamura, N. (1992). Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of single chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119.
- 35 Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte-growth factor. *Nature* 342, 440-443.
- Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F., and Comoglio, P. M. (1992). Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 11, 4825-4833.
- 40 Okigaki, M., Komada, M., Uehara, Y., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (1992). Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry* 31, 9555-9561.
- Parry, M. A., Fernandez-Catalan, C., Bergner, A., Huber, R., Hopfner, K. P., Schlott, B., Guhrs, K. H., and Bode, W. (1998). The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action. *Nat. Struct. Biol.* 5, 917-923.
- 45 Peek, M., Moran, P., Mendoza, N., Wickramasinghe, D., and Kirchofer, D. (2002). Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J. Biol. Chem.* 277, 47804-47809.
- Peisach, E., Wang, J., de los Santos, T., Reich, E., and Ringe, D. (1999). Crystal structure of the proenzyme domain of plasminogen. *Biochemistry* 38, 11180-11188.
- 50 Perona, J. J., and Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4, 337-360.
- Rawlings, N. D., O'Brien, E., and Barrett, A. J. (2002). MEROPS: the protease database. *Nucl. Acid Res.* 30, 343-346.
- 55 Renatus, M., Engh, R. A., Stubbs, M. T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U., and W., B. (1997). Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J.* 16, 4797-4805.
- Richardson, J. L., Kroger, B., Hoeffken, W., Sadler, J. E., Pereira, P., Huber, R., Bode, W., and Fuentes-Prior, P. (2000). Crystal structure of the human α -thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO J.* 19, 5650-5660.
- 60 Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1995). Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* 229, 257-261.
- Stubbs, M., and Bode, W. (1993). A player of many parts: The spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 69, 1-58.
- 65 Takeuchi, T., Shuman, M. A., and Craik, C. S. (1999). Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11054-11061.

- Trusolino et al., *FASEB J.* (1998), 12:1267-1280.
- Trusolino, L., and Comoglio, P. M. (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nature Rev. Cancer* 2, 289-300.
- 5 Tsiang, M., Jain, A. K., Dunn, K. E., Rojas, M. E., Leung, L. L. K., and Gibbs, C. S. (1995). Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 16854-16863.
- Vijayalakshmi, J., Padmanabhan, K. P., Mann, K. G., and Tulinsky, A.(1994). The isomorphous structures of prethrombin2, hirugen-, and PPACK-thrombin: changes accompanying activation and exosite binding to thrombin. *Protein Sci.* 3, 2254-2271.
- 10 Wang, D., Bode, W., and Huber. R (1985). Bovine chymotrypsinogen A: x-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* 185, 595-624.
- Wang, D., Julian, F. M., Breathnach, R., Godowski, P. J., Takehara, T., Yoshikawa, W., Hagiya, M., and Leonard, E. J. (1997). Macrophage stimulating protein (MSP) binds to its receptor via the MSP β chain. *J. Biol. Chem.* 272, 16999-17004.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula antagonista de HGF/C-Met que comprende un mutante de HGF que comprende una mutación en la cadena β de HGF en la posición V495, G498, R502 más T503, o D672, en la que la mutación en la cadena β de HGF impide la inserción del extremo N terminal de la cadena β de HGF en un bolsillo de unión a HGF, y en la que el mutante de HGF resultante presenta una función biológica reducida en comparación con el HGF de tipo natural.
- 10 2. Molécula antagonista, según la reivindicación 1, en la que la función biológica es la proliferación celular, la migración celular, la fosforilación de Met o la angiogénesis.
- 15 3. Molécula antagonista, según la reivindicación 1 ó 2, en la que el mutante de HGF resultante se une a C-Met con una afinidad de unión sustancialmente reducida en comparación con el HGF de tipo natural.
- 20 4. Molécula antagonista, según la reivindicación 1 ó 2, en la que el mutante de HGF resultante se une a C-met con una afinidad sustancialmente equivalente a la del HGF de tipo natural.
- 25 5. Molécula antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la mutación en la cadena β de HGF es V495G, V495A, G498I, G498P, G498V, R502del más T503del, o D672N.
- 30 6. Molécula antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula comprende aminoácidos de tipo natural en las posiciones 534, 578, 619, 673, 692, 693, 694, 695, 696, 699 y/o 702.
- 35 7. Molécula antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula presenta una capacidad de señalización de C-met reducida en comparación con el HGF de tipo natural.
- 40 8. Molécula antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula presenta una capacidad reducida para estimular la migración celular en comparación con el HGF de tipo natural.
- 45 9. Molécula antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula presenta una capacidad reducida para estimular la proliferación celular en comparación con el HGF de tipo natural.
- 50 10. Molécula antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula presenta una capacidad reducida para estimular la angiogénesis en comparación con el HGF de tipo natural.
- 55 11. Molécula antagonista de HGF/c-met, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para utilizar en un método de reducción de la activación de c-Met en un sujeto.
- 60 12. Molécula antagonista para utilizar, según la reivindicación 11, para reducir la proliferación de una célula en un sujeto.
- 65 13. Molécula antagonista para utilizar, según la reivindicación 11, para reducir la migración de una célula en un sujeto.
14. Molécula antagonista para utilizar, según la reivindicación 11, para reducir la actividad angiogénica de una célula en un sujeto.
15. Molécula antagonista de HGF/c-met, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para utilizar en un método de tratamiento de una afección patológica asociada con la activación de c-Met en un sujeto.
16. Molécula antagonista para utilizar, según la reivindicación 15, en la que la afección patológica es cáncer.
17. Utilización de una molécula antagonista de HGF/c-Met, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección patológica asociada con la activación de c-Met en un sujeto, en la que la afección patológica es cáncer.
18. Ácido nucleico que codifica la molécula antagonista de HGF/c-Met, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
19. Célula huésped, que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 18.
20. Artículo de fabricación que comprende un recipiente que comprende una o más moléculas antagonista de HGF/c-Met según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
21. Método de producción de la molécula antagonista de HGF/c-Met, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo dicho método expresar en una célula huésped un ácido nucleico que codifica la molécula antagonista, y recuperar la molécula antagonista de la célula.

Figura 1A

HGF No.	Quimiotripsinógeno No.	Mutación	Migración celular MDA-MB435 % wt	Migración celular SD	n	unión HGF β/MetIlgG IC50mut/IC50wt (C604S bkgd)	n
WT			100			1	
V495	16	<u>delección</u>	20.0	8.7	6	>100	1
		<u>Gly</u>	0.0	13.9	6	>100	3
		<u>Ala</u>	6.2	19.4	5	>100	3
N497	18	Arg	53.3	15.3	8	1.7 ± 0.4	4
		Lys	63.5	27.1	8	3.0 ± 0.5	4
		Phe	83.1	13	8	6.1 ± 0.4	3
		Ala	102.5	22.1	8	1.5 ± 0.2	4
		Glu	87.7	15.9	8	5.6 ± 0.4	4
G498	19	<u>Ile</u>	-1.1	10.8	8	>100	3
		<u>Pro</u>	18.2	12.5	8	>100	3
		<u>Val</u>	-1.2	11.9	8	>100	3
		Ala	77.4	16.3	8	1.0 ± 0.1	3
		Ser	82.6	28	8	1.9 ± 0.1	3
PS00	21	Trp	79.3	18.3	8	2.3	1
		His	79.9	20.6	8	1.6 ± 0.3	3
		Glu	76.1	21.1	8	0.5 ± 0.03	3
501/R502	22/23	Arg501a/Ser501b Ins				1.4 ± 0.3	3
R502	23	Arg502 del	77.5	15.1	8	1 ± 0.1	3
.502/T503	23	Arg502/Thr503 del				12 ± 1	3
D672	194	<u>Asn</u>	-2.0	14.3		57 ± 5	3

Figura 1B

Unión de mutantes de HGF de longitud completa a Met en un ensayo de unión de competición

Mutante de HGF [numeración de quimiotripsinógeno]	Unión de competición HGF/Met $IC_{50}(\text{mut})/IC_{50}(\text{wt})$
WT	1
V495A [c16]	$0,8 \pm 0,1$
V495G [c16]	$1,7 \pm 0,1$
V495del [c16del]	$0,7 \pm 0,2$
D672N [c194]	$2,0 \pm 0,8$
G498A [c19]	$0,7 \pm 0,2$
G498I [c19]	$1,1 \pm 0,5$
G498P [c19]	$1,1 \pm 0,2$
G498V [c19]	$1,3 \pm 0,4$

Figura 1C

Inhibición de la migración de células MDA-MB435 y la proliferación de BxPC3 por mutantes de HGF de longitud completa (n = 4)

Mutante de HGF	Migración de MDA-MB435		Proliferación de BxPC3	
	HGFmut 200 nM	HGFmut 20 nM	HGFmut 20 nM	HGFmut 200 nM
	% de control \pm SD	% de control \pm SD	% de control \pm SD	% de control \pm SD
V495G	28,0 \pm 19,5	63,4 \pm 15,5		-5,3 \pm 6,6
D672N	26,0 \pm 7,4	57,4 \pm 14,1		4,4 \pm 9,3
G498I	21,1 \pm 17,6	38,5 \pm 20,7		-12,0 \pm 11,2
scHGF	15,2 \pm 6,1	46,5 (n = 2)		9,3 (n = 2)

Figura 2A

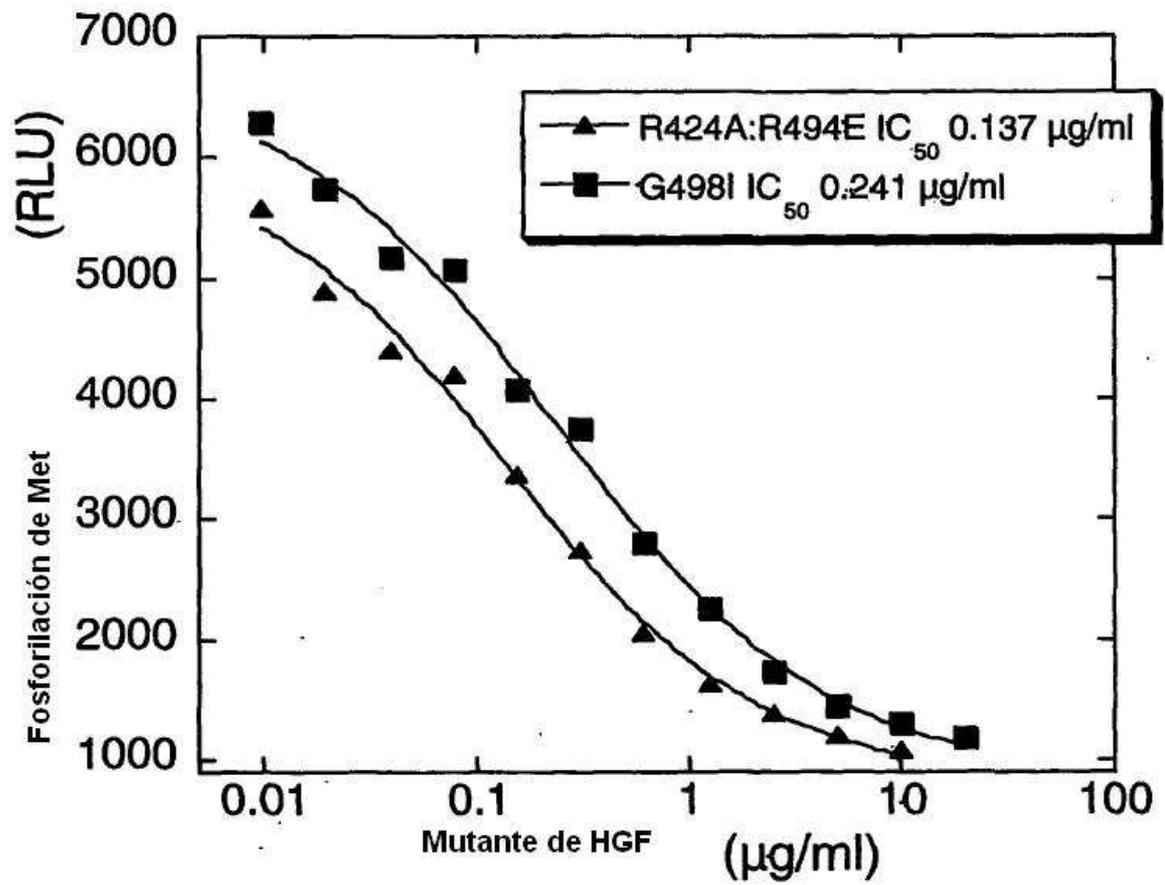


Figura 2B

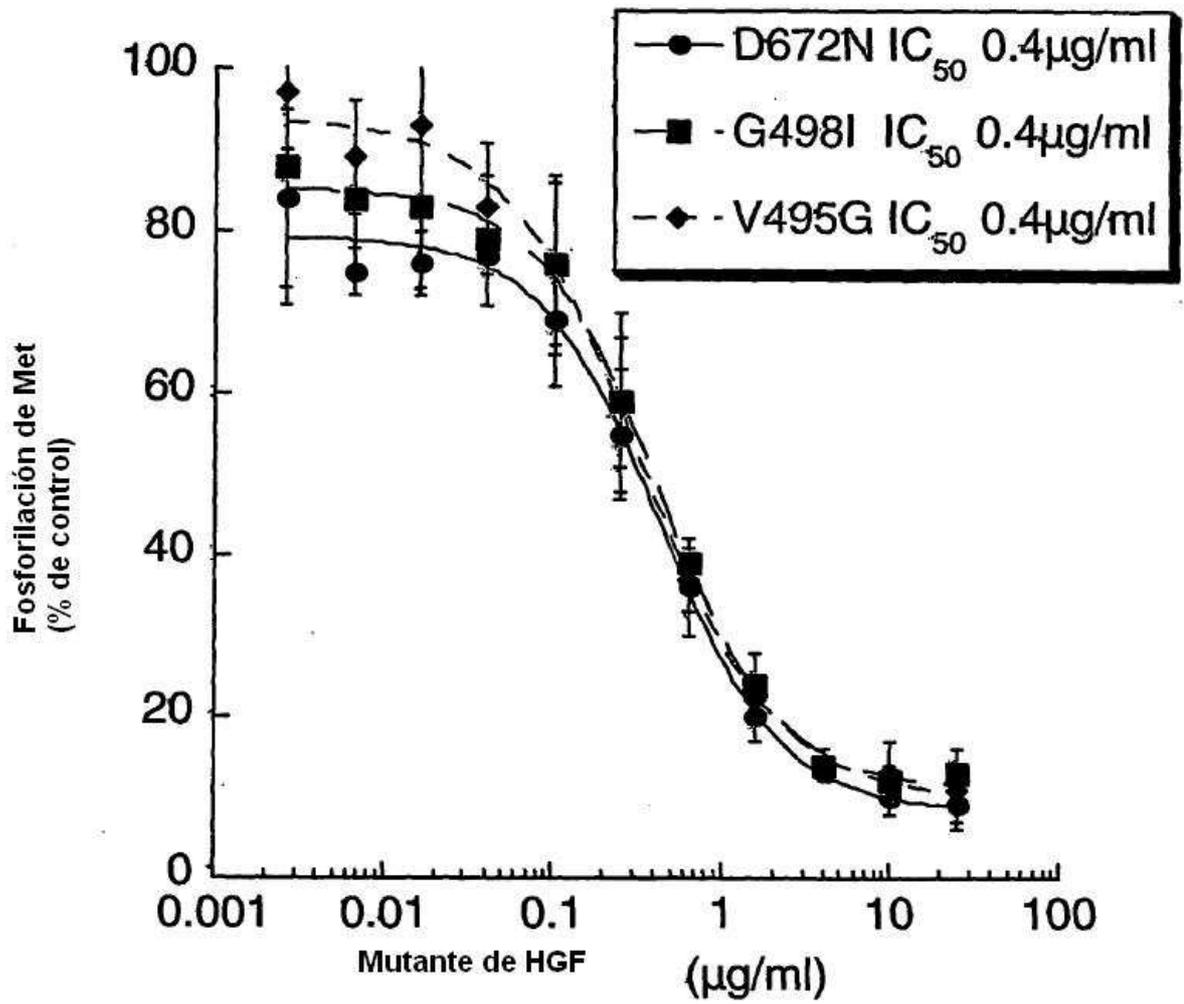


Figura 3A

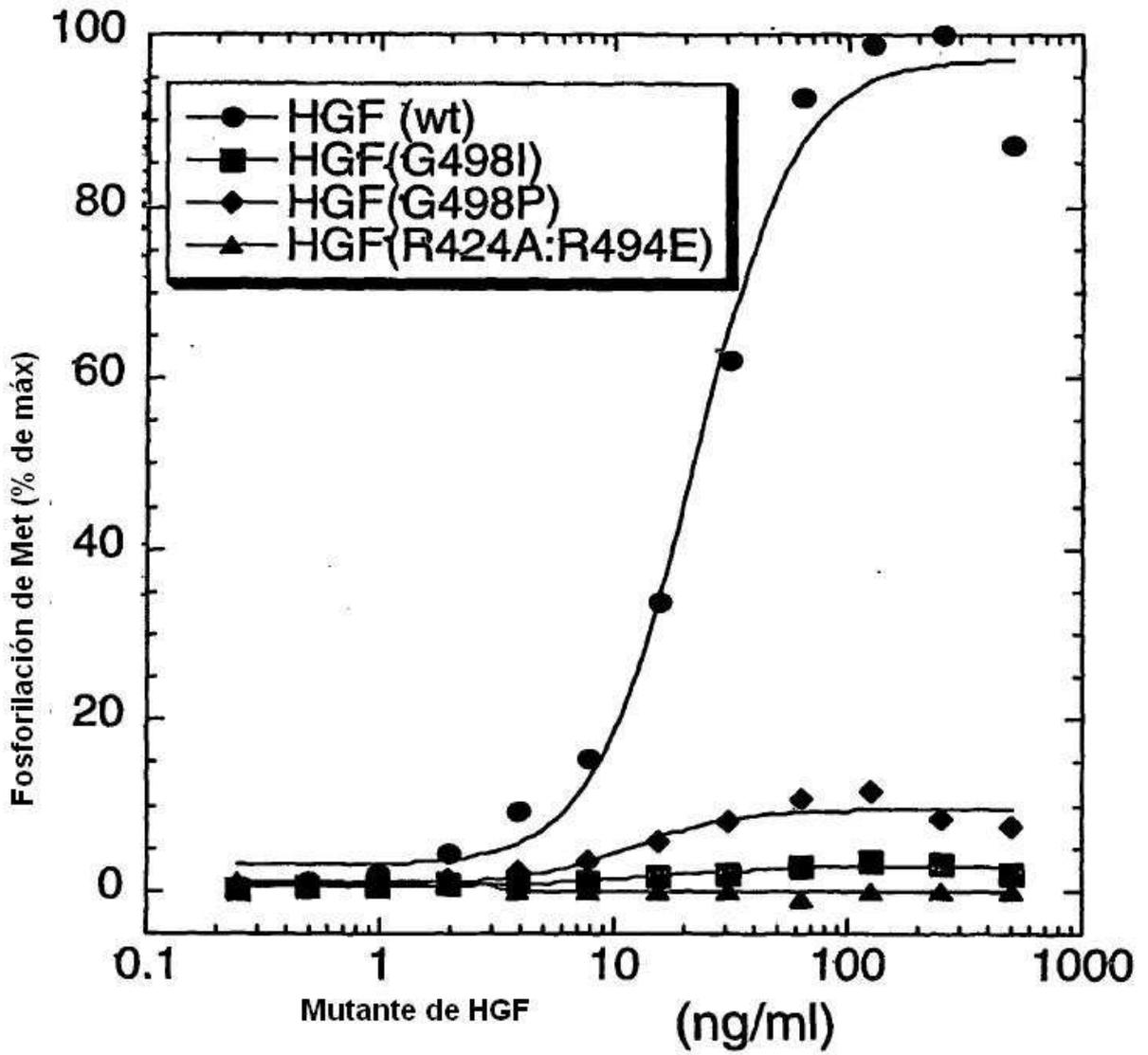


Figura 3B

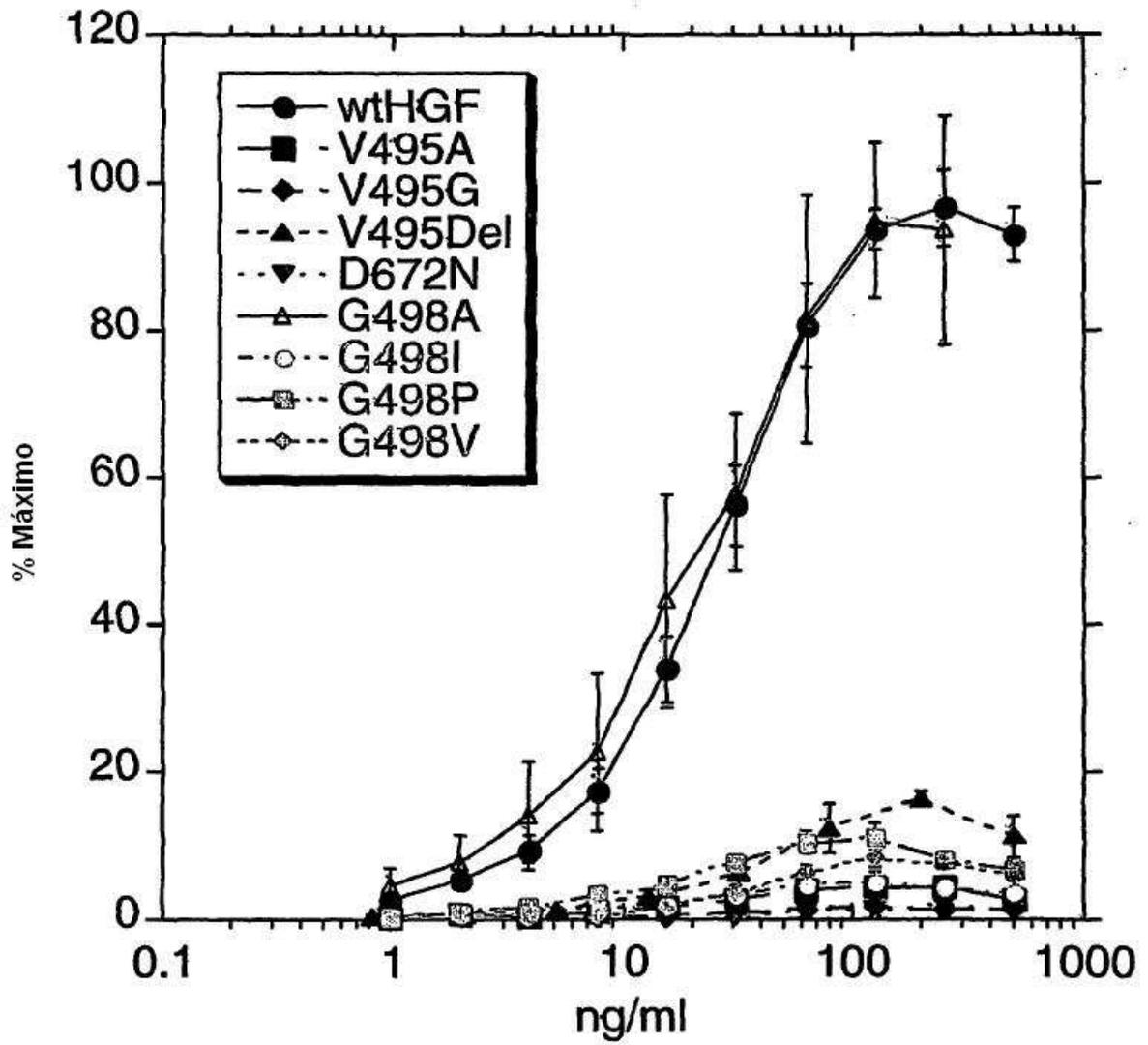


Figura 4

